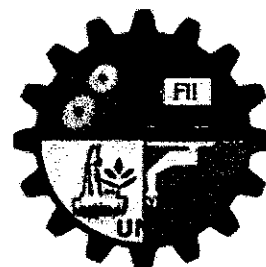


UNIVERSIDAD NACIONAL DE PIURA



**FACULTAD DE INGENIERÍA INDUSTRIAL
ESCUELA DE AGROINDUSTRIAS E INDUSTRIAS
ALIMENTARIAS**



**“PRODUCCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLE A PARTIR
DE BIOMASA LIGNOCELULÓSICA DE SORGO
DULCE (*Sorghum bicolor* Var. *Sugar Drip*) POR
EXTRACCIÓN CON VAPOR”**

Presentada por:

VICTOR HUGO CHANTA TORRES

**TESIS PARA OPTAR EL TITULO DE
INGENIERO AGROINDUSTRIAL E INDUSTRIAS
ALIMENTARIAS**

PIURA – PERÚ

2015

**“PRODUCCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLE A PARTIR DE BIOMASA
LIGNOCELULÓSICA DE SORGO DULCE (*Sorghum bicolor* Var.
Sugar Drip) POR EXTRACCIÓN CON VAPOR”**

TESIS

**PRESENTADA A LA FACULTAD DE INGENIERÍA INDUSTRIAL COMO
REQUISITO PARA OPTAR EL TÍTULO DE INGENIERO AGROINDUSTRIA
E INDUSTRIAS ALIMENTARIA.**

APROBADA:



Dr. ALFREDO LUDENA GUTIERREZ
PATROCINADOR



Ing. ANTHONY ADANAQUE TIMANA M.Sc.
CO – ASESOR

JURADO:



Ing. DANIEL CRUZ GRANDA
PRESIDENTE



Ing. CARLOS COELLO OBALLE
(VOCAL)

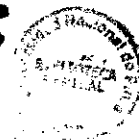
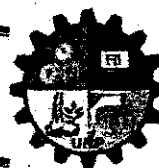


Ing. RICARDO SEMINARIO VÁSQUEZ
SECRETARIO

PIURA – PERÚ
2015



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE PIURA
FACULTAD DE INGENIERÍA INDUSTRIAL
DECANATO**



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los Miembros del Jurado Calificador Ad-Hoc de la Tesis denominada: **«PRODUCCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLE A PARTIR DE LA BIOMASA LIGNOCELULÓSICA DE SORGO DULCE (*Sorghum bicolor* Var. *Sugar Drip*) POR EXTRACCIÓN CON VAPOR»**, presentada por el señor **VÍCTOR HUGO CHANTA TORRES**, Bachiller de la Escuela Profesional en Ingeniería Agroindustrial e Industrias Alimentarias; asesorada por el **Dr. Alfredo Lázaro Ludeña Gutiérrez** y co asesorada por el **Ing. Anthony Adanaqué Timaná, MSc.**; reunidos para la sustentación de ésta y luego de escuchar su exposición y las respuestas a las preguntas formuladas, la declaran:



Con el Calificativo:

APROBADA

BUENO

En consecuencia el sustentante se encuentra apto para recibir el título profesional de **INGENIERO AGROINDUSTRIAL E INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**, conforme a Ley.

Piura, 10 de enero del 2015

Ing. DANIEL ENRIQUE CRUZ GRANDA, MSc.
PRESIDENTE - JURADO CALIFICADOR

Ing. CARLOS ENRIQUE COELLO OBALLE, MSc.
VOCAL - JURADO CALIFICADOR

Ing. RICARDO GERÓNIMO SEMINARIO VÁSQUEZ, MSc.
SECRETARIO - JURADO CALIFICADOR



DEDICATORIA

Dedicado a mi sobrino, a mi madre y a mi abuelita: Denis, Dora y Balvina con mucho cariño y amor en señal de reconocimiento por su esfuerzo y sacrificio que hicieron posible para mí, esta noble profesión

A la memoria de mi hermana: Kary Mabel y de mis abuelitos Catalina, Augusto e Hipólito

AGRADECIMIENTO

En primer lugar a Dios por ser mi luz y guía en las acciones que he tomado en mi vida. Y sobre todo, por darme la fuerza para alcanzar mis metas.

A mi madre quien siempre creyó en que podría alcanzar estas metas que me he trazado y que nunca me retiró el apoyo, la confianza y sobre todo el amor.

A mi co-asesor Ing. Anthony Adanaque Timana M.Sc. quien posibilitó con su eficacia, conocimiento científico y técnico la realización del presente trabajo.

Al Ing. Melesio y Danitza dos amigos por apoyarme con sus conocimientos en análisis de laboratorio

Al Mtblgo. Cesar Torres por su colaboración

A la empresa Caña Brava por accederme su laboratorio de control de calidad

A todas aquellas personas que de una u otra manera han hecho posible la culminación de este humilde trabajo

RESUMEN

El presente trabajo de investigación consistió en determinar el nivel de producción de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica de Sorgo Dulce (*Sorghum bicolor* Var. Sugar Drip) por extracción con vapor.

Para la realización de la investigación se utilizó biomasa lignocelulósica hojas y tallo (muestras de 2.5 Kg), de sorgo dulce (*Sorghum bicolor* Var. Sugar drip) proporcionado por la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Piura. Y paso por etapas de molienda, pretratamiento con vapor (210 y 200 °C por 5 y 10 minutos); fermentación anaerobia realizada por la Bacteria *Zimomonas Mobilis*; y destilación simple, fraccionada y deshidratación molecular hasta obtener etanol.

La producción de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica Sorgo Dulce, fluctúa entre: 136.73 a 408.88 ml Etanol.kg de sustrato⁻¹ para hojas, y 146.68 a 640.72ml Etanol.kg de sustrato⁻¹ para tallo.

El análisis físico químico de la biomasa lignocelulósica tallo fue: Humedad 72.31%, Grasa total 0.37%, Cenizas 8.59%, Materia Orgánica 91.41%, Nitrógeno total 1.45%, Fosforo 0.15%, Celulosa 41.78%, Hemicelulosa 26.28% y Lignina 31.02%. Y para hoja fue: Humedad 44.42%, Grasa total 3.33%, Cenizas 10.33%, Materia Orgánica 89.67%, Nitrógeno total 1.71%, Fosforo 0.92%, Celulosa 36.35%, Hemicelulosa 21.44% y Lignina 27.99%

La fermentación se desarrolló entre 0.13 y 5.45 °brix, pH entre 3.47 y 5.45, acidez total 1.240 - 2.286 % ác. Sulfúrico.

La máxima concentración de etanol en la fermentación y rendimiento de producción bioetanol la obtuvo el tratamiento Tallo x 210 °C x 5.0 min con 16.09 % p.v⁻¹ y 640.72 ml de etanol/kg de sustrato.

En el análisis de calidad del bioetanol producido según los tratamientos evaluados cumplen los parámetros dados por INDECOPI en la NTP N° 321.126.2011, para etanol anhidro no desnaturalizado. Destacando los tratamiento Tallo x 210 °C x 5.0 min y Hojas x 210 °C x 5.0 min al obtener mejores resultados.

ABSTRACT

The following research work consisted in determine the production level of bioethanol from lignocellulosic biomass of sweet sorghum (*Sorghum bicolor* var. Sugar Drip) extraction steam.

To this investigation it was used lignocellulosic biomass leaves and stem (2.5kg sample), of sweet sorghum (*Sorghum bicolor* var. Sugar Drip) provided by the faculty of Agronomy of the National University of Piura, and step by stages of grinding, steam pretreatment (210 and 200 ° C per 5 and 10 minutes); anaerobic fermentation performed by the *Zimomonas Mobilis* bacteria, and simple distillation, and molecular dehydration to obtain ethanol.

The production of bioethanol from lignocellulosic biomass swett sorghum, fluctuates between 136.73 to 408.88ml.kg substrate⁻¹ sheets and 146.68 to 640.72 ml ethanol .kg stem substrate⁻¹.

The chemical physical análisis of lignocellulosic biomass was humidity 72.31%,total fat 0.37 % , ash 8.59 % ,organic matter 91.41% , total nitrogen 1.45% , phosphorus 0.15% , cellulose 41.78%, hemicellulose 26.28% and lignin 31.02% and to leaves humidity 44.42% , total fat 3.33% ,ash 10.33%, organic matter 89.67%, total nitrogen 1.71%, phosphorus 0.92% ,cellulose 36.35 % , hemicellulose 21.44% , and lignin 27.99%.

The fermentation was developed between 0.13 and 5.45 °brix, ph between 3.47 and 5.45 total acidity 1.240 – 2.286 % ac. Sulfuric.

The maximum concentration of ethanol in the fermentation and result of production was obtain by stem treatment x 210°C x 5.0 min with 16.09% p.v⁻¹ and 640.72 ml of ethanol /kg of substrate.

The treatments meet the parameters evaluated given by INDECOPI in the NTP N° 321.126.2011, to anhydrous ethanol undernatured. highlighting the treatment of stem x 210°C x 5.0 min and leaves x 210 °C x 5.0 min to obtain better results.

ÍNDICE GENERAL

Titulo	Pág.
DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTO	ii
RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
ÍNDICE GENERAL	v
ÍNDICE DE CUADROS	vii
ÍNDICE DE TABLAS	x
ÍNDICE DE GRÁFICOS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xiv
ÍNDICES DE DIAGRAMAS	xiv
ÍNDICES DE ANEXOS	xv
CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO.	3
2.1.Sorgo dulce (<i>sorghum bicolor</i> var. sugar drip)	3
2.1.1. Composición química de la biomasa lignocelulosa de sorgo dulce	4
2.1.2. Importancia del sorgo dulce	4
2.2.Biomasa lignocelulósica como materia prima para la producción de etanol	5
2.2.1. Fuente de biomasa	5
2.2.2. Composición y estructura de la biomasa lignocelulósica	5
2.2.2.1. Polisacáridos	5
2.2.2.2. Lignina	7
2.2.2.3. Otras sustancias	9
2.3. Producción de etanol por vía enzimática a partir de biomasa lignocelulósica	9
2.3.1. Pretratamiento	10
2.3.1.1. Pretratamiento de explosión por vapor	12
2.3.1.2. Compuestos tóxicos generados en el pretratamiento	13
2.3.1.3. Efectos de los compuestos tóxicos sobre los microorganismos	14
2.3.2. Hidrólisis enzimática	15

2.3.3. Fermentación	16
2.3.4.1. Fermentación de la xilosa	17
2.4. Integración de las etapas de proceso	18
2.4.1. Hidrólisis y fermentación separadas	18
2.4.2. Sacarificación y fermentación simultáneas	18
2.4.3. Sacarificación y cofermentación simultáneas	19
2.4.4. Bioproceso consolidado	20
2.5. Destilación	22
2.6. Producción nacional y regional de Sorgo dulce	22
2.7. Subproducto de la destilación.	22
2.7.1. Anhídrido carbónico.	22
2.7.2. Vinaza	22
2.7.3. Aceite fusel (fusel oil)	23
2.7.4. Congéneres.	24
2.8. Impurezas presentes en alcoholes destilados.	24
2.8.1. Ácidos	24
2.8.2. Aldehídos	24
2.8.3. Ésteres	25
2.8.4. Alcoholes superiores.	26
2.9. Disminución de contaminantes atmosféricos por la industria del etanol	26
 CAPÍTULO III MATERIALES Y MÉTODOS	 27
3.1. Lugar y fecha de ejecución del trabajo	27
3.2. Materia prima e insumos	27
3.3. Materiales, equipos y reactivos	27
3.3.1. Material de vidrio	27
3.3.2. Otros Materiales	27
3.3.2.1. Equipos	28
3.3.2.2. Reactivos	28
3.4. Metodología para la producción de biocombustible a partir de biomasa lignocelulósica sorgo dulce.	29
3.4.1. Análisis de la Biomasa Lignocelulósica de sorgo dulce	31
3.4.2. Métodos de Análisis Físico Químicos	31
3.4.3. Análisis del producto final.	32

3.4.4. Diseño experimental y análisis estadístico.	36
3.4.4.1. Tratamientos	36
3.4.4.2. Diseño Estadístico	36
3.4.4.3. Análisis Estadístico	37
CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
4.1. Análisis de físico químico de biomasa lignocelulósica de Sorgo Dulce	39
4.2. Análisis de fermentación	41
4.2.1. Variación de sólidos solubles totales.	41
4.2.2. Variación de pH	42
4.2.3. Variación de acidez (% Ac. Sulfúrico)	43
4.3. Rendimiento Físico (ml Etanol.kg de sustrato ⁻¹)	44
4.4. Producción de etanol (%p.v ⁻¹)	50
4.5. Tasa de producción alcohólica (gh.l ⁻¹)	55
4.6. Análisis cromatográfico del etanol	57
4.6.1. Grado alcohólico (°G.L.)	57
4.6.2. Determinación de Densidad (g.cm ⁻³)	60
4.6.3. Determinación de pH	65
4.6.4. Determinación de Alcoholes Superiores(ppm Alcoholes Superiores)	68
4.6.5. Determinación de Aldehídos (ppm Furfural)	73
4.6.6. Determinación de Acidez (mg Ácido Acético.L Alcohol Anhidro ⁻¹)	77
4.6.7. Determinación de Esteres (ppm Acetato de Etilo)	82
4.6.8. Determinación de Metanol (ppm metanol)	87
4.7. Análisis económico	92
CONCLUSIONES	93
RECOMENDACIONES	94
BIBLIOGRAFÍA	95
ANEXOS	101
ANEXO I. Análisis de biomasa lignocelulósica del cultivo de Sorgo Dulce	102
ANEXO II. Análisis de fermentación de biomasa lignocelulósica del cultivo de Sorgo Dulce.	102
ANEXO III. Determinaciones de características físico- químicas del bioetanol obtenido a partir de la biomasa lignocelulósica del cultivo de Caña de Azúcar.	107

ÍNDICE DE CUADROS

Nº	Titulo	Pág.
1.1.	Composición de celulosa, hemicelulosa y lignina en residuos agrícolas, forestales y desechos. SUN, Y; CHENG, J. (2002)	9
1.2.	Descripción de las diferentes configuraciones de proceso con diferentes niveles de integración.	21
1.3.	Principales componentes de la vinaza.	23
1.4.	Principales componentes del aceite fusel obtenido a partir de diferentes sustratos.	23
1.5.	Propiedades fisicoquímicas de los aldehídos formados en las fermentaciones industriales.	24
1.6.	Propiedades físicas de los esteres más importantes formados en la fermentación alcohólica.	25
4.1.	Análisis físico – químico de biomasa lignocelulósica promedio del cultivo de Sorgo Dulce.	40
4.2.	Análisis de varianza para el rendimiento físico (ml Etanol.kg de sustrato ⁻¹).	47
4.3.	Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad para los efectos principales Tipo de sustrato, Temperaturas de extracción por vapor (°C), Tiempo de extracción por vapor (min) e interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min)), sobre el rendimiento físico (ml Etanol. kg de sustrato ⁻¹).	47
4.4.	Análisis de varianza para la producción de etanol (%p.v ⁻¹).	52
4.5.	Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad para los efectos principales Tipo de sustrato, Temperaturas de extracción por vapor (°C), Tiempo de extracción por vapor (min) e interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min)), sobre la producción de etanol (%p.v ⁻¹).	52
4.6.	Tasa promedio de producción alcohólica (gh.l ⁻¹).	55
4.7.	Análisis de varianza para el grado alcohólico (°G.L.)	59

4.8.	Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad para los efectos principales Tipo de sustrato, Temperaturas de extracción por vapor (°C), Tiempo de extracción por vapor (min) e interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min)), sobre el grado alcohólico (°G.L.).	59
4.9.	Análisis de varianza para la densidad (g.cm ⁻³).	62
4.10.	Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad para los efectos principales Tipo de sustrato, Temperaturas de extracción por vapor (°C), Tiempo de extracción por vapor (min) e interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min)), sobre la concentración de densidad (g.cm ⁻³).	62
4.11.	Análisis de varianza para el pH.	67
4.12.	Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad para los efectos principales Tipo de sustrato, Temperaturas de extracción por vapor (°C), Tiempo de extracción por vapor (min) e interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min)), sobre el pH.	70
4.13.	Análisis de varianza para la concentración Alcoholes Superiores (ppm alcoholes superiores).	70
4.14.	Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad para los efectos principales Tipo de sustrato, Temperaturas de extracción por vapor (°C), Tiempo de extracción por vapor (min) e interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min)), sobre la concentración Alcoholes Superiores (ppm alcoholes superiores).	70
4.15.	Análisis de varianza para la concentración de aldehídos (ppm Furfural).	75
4.16.	Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad para los efectos principales Tipo de sustrato, Temperaturas de extracción por vapor (°C), Tiempo de extracción por vapor (min) e interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min)), sobre la concentración de aldehídos (ppm Furfural).	75
4.17.	Análisis de varianza para la acidez (mg Ácido Acético.L Alcohol Anhidro ⁻¹).	79
4.18.	Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad para los efectos principales Tipo de sustrato, Temperaturas de extracción por vapor (°C), Tiempo de extracción por vapor (min) e interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción	79

	por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min)), sobre la acidez (mg Ácido Acético.L Alcohol Anhidro ⁻¹).	
4.19.	Análisis de varianza para la concentración de esteres (ppm Acetato de Etilo).	84
4.20.	Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad para los efectos principales Tipo de sustrato, Temperaturas de extracción por vapor (°C), Tiempo de extracción por vapor (min) e interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min)), sobre la concentración de esteres (ppm Acetato de Etilo).	84
4.21.	Análisis de varianza para la concentración metanol (ppm metanol).	89
4.22.	Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad para los efectos principales Tipo de sustrato, Temperaturas de extracción por vapor (°C), Tiempo de extracción por vapor (min) e interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min)), sobre la concentración metanol (ppm metanol)	89

ÍNDICE DE TABLAS

Nº	Título	Pág.
2.1.	Cuantificación de la contaminación por emisiones atmosféricas producidas / hectárea quemada de cultivo de la caña de azúcar.	26
3.1.	Análisis físico – químico de la biomasa lignocelulósica del cultivo de sorgo dulce	31
3.2.	Análisis de mosto biomasa lignocelulósica de sorgo dulce pretratada durante la etapa de fermentación.	32
3.3.	Determinaciones de características físico- químicas del bioetanol obtenido a partir de la biomasa lignocelulósica del cultivo de sorgo dulce.	32
3.4.	Componentes utilizados para Solución patrón – A	34
3.5.	Tratamientos	36
3.6.	Diseño de Factorial.	37
3.7.	Análisis de varianza para el experimento	38

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Nº	Título	Pág.
4.1.	Variación del contenido de sólidos solubles (°Brix) en el proceso de fermentación para los tratamientos estudiados.	41
4.2.	Variación del pH en el proceso de fermentación para los tratamientos estudiados.	42
4.3.	Variación del contenido de Acidez (% Ac. Sulfúrico) en el proceso de fermentación para los tratamientos en estudio.	43
4.4.	Efecto principal tipo de sustrato sobre el rendimiento físico (ml Etanol. kg de sustrato ⁻¹), del etanol obtenido como producto.	48
4.5.	Efecto principal Temperaturas de extracción por vapor (°C), sobre el rendimiento físico (ml Etanol. kg de sustrato ⁻¹), del etanol obtenido como producto.	48
4.6.	Efecto principal Tiempo de extracción por vapor (min.), sobre el rendimiento físico (ml Etanol. kg de sustrato ⁻¹), del etanol obtenido como producto.	49
4.7.	Efecto de la interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min)), sobre el rendimiento físico (ml Etanol. kg de sustrato ⁻¹), del etanol obtenido como producto.	49
4.8.	Efecto principal tipo de sustrato, sobre la producción de etanol (%p.v ⁻¹) del etanol obtenido como producto.	53
4.9.	Efecto principal Temperaturas de extracción por vapor (°C), sobre la producción de etanol (%p.v-1), del etanol obtenido como producto.	53
4.10.	Efecto principal Tiempo de extracción por vapor (min.), sobre la producción	54
4.11.	Efecto de la interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min)), sobre la producción de etanol (%p.v-1), del etanol obtenido como producto.	54
4.12	Tasa promedio de producción alcohólica (gh.l ⁻¹).	56
4.13.	Efecto principal tipo de sustrato, sobre la densidad (g.cm ⁻³) del etanol obtenido como producto.	63

4.14. Efecto principal Temperaturas de extracción por vapor (°C), sobre la densidad (g.cm ⁻³) del etanol obtenido como producto.	63
4.15. Efecto principal Tiempo de extracción por vapor (min), sobre densidad (g.cm ⁻³) del etanol obtenido como producto.	64
4.16. Efecto de la interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min)), sobre la densidad (g.cm ⁻³), del etanol obtenido como producto.	64
4.17. Efecto principal tipo de sustrato, sobre la concentración de alcoholes superiores (ppm alcoholes superiores) del etanol obtenido como producto.	71
4.18. Efecto principal Temperaturas de extracción por vapor (°C), sobre la concentración de alcoholes superiores (ppm alcoholes superiores) del etanol obtenido como producto.	71
4.19. Efecto principal Tiempo de extracción por vapor (min.), sobre la concentración de Alcoholes Superiores (ppm alcoholes superiores) del etanol obtenido como producto.	72
4.20. Efecto de la interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min)), sobre la concentración de Alcoholes Superiores (ppm alcoholes superiores) del etanol obtenido como producto.	72
4.21. Efecto principal Temperaturas de extracción por vapor (°C), sobre la concentración de aldehídos (ppm Furfural) del etanol obtenido como producto.	76
4.22. Efecto de la interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min)), sobre la concentración de aldehídos (ppm Furfural) del etanol obtenido como producto.	76
4.23. Efecto principal Temperaturas de extracción por vapor (°C), sobre la Acidez Total (mg Ácido Acético.L Alcohol Anhidro ⁻¹), del etanol obtenido como producto.	80
4.24. Efecto principal Tiempo de extracción por vapor (min.), sobre la Acidez Total (mg Ácido Acético.L Alcohol Anhidro ⁻¹), del etanol obtenido como producto.	80
4.25. Efecto de la interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min)), sobre la acidez total (mg Ácido Acético.L Alcohol Anhidro ⁻¹) del etanol obtenido como producto.	81
4.26. Efecto principal Temperaturas de extracción por vapor (°C), sobre la	85

concentración de esteres (ppm Acetato de Etilo) del etanol obtenido como producto.	
4.27. Efecto principal Tiempo de extracción por vapor (min.), sobre la concentración de esteres (ppm Acetato de Etilo), del etanol obtenido como producto.	85
4.28. Efecto de la interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min)), sobre la concentración de esteres (ppm Acetato de Etilo) del etanol obtenido como producto	86
4.29. Efecto principal tipo de sustrato, sobre la concentración de metanol (ppm metanol) del etanol obtenido como producto.	90
4.30. Efecto principal Temperaturas de extracción por vapor (°C), sobre la concentración de metanol (ppm metanol) del etanol obtenido como producto.	90
4.31. Efecto principal Tiempo de extracción por vapor (min.), sobre la concentración de metanol (ppm metanol) del etanol obtenido como	91
4.32. Efecto de la interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min)), sobre la concentración de metanol (ppm metanol) del etanol obtenido como producto.	91

ÍNDICE DE FIGURAS

Nº	Título	Pág.
1.1.	Estructura primaria de la celulosa.	6
1.2.	Estructura del O-acetil-4-O-metilglucuronoxilano.	6
1.3.	Estructura del glucomanano.	6
1.4.	Estructura del arabino-4-O-metilglucuronoxilano.	7
1.5.	Estructura del O-acetil-galactoglucomanano.	7
1.6.	Estructura de la lignina.	8
1.7.	Alcoholes cinámílicos precursores de la lignina	8
1.8.	Rutas tecnológicas para la obtención de bioetanol	10
1.9.	Principales productos de degradación originados en el pretratamiento de la biomasa lignocelulósica.	14
1.10.	Diferentes rutas de la fermentación de la xilosa en bacterias o levaduras fermentadoras de xilosa.	17
2.1.	Operaciones del proceso de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica del sorgo dulce.	30
2.2.	Rendimiento físico de Biomasa lignocelulósica del sorgo dulce.	31

ÍNDICES DE DIAGRAMAS

Nº	Título	Pág.
01	Rendimiento físico del proceso de producción de etanol a de Biomasa Lignocelulósica de Sorgo Dulce (<i>Sorghum bicolor</i> Var. <i>Sugar Drip</i>).	46

ÍNDICE DE ANEXOS

Nº	Título	Pág.
1.1.	Análisis físico – químico de la biomasa lignocelulósica del cultivo de Sorgo Dulce.	102
2.1.	Datos de variación de sólidos solubles (°Brix) en la etapa de fermentación.	102
2.2.	Datos de variación de pH en la etapa de fermentación.	103
2.3.	Datos de variación de acidez (% ác. sulfúrico) en la etapa de fermentación	103
2.4.	Rendimiento físico (l.ha ⁻¹)	104
2.5.	Datos de producción de etanol (%p.v ⁻¹) durante el proceso de fermentación.	105
2.6.	Datos de taza de producción de etanol (g h.l ⁻¹)	106
3.1.	Determinación de la concentración del etanol (°G.L.) obtenido en la etapa de la destilación.	107
3.2.	Determinación de la densidad (g.cm ⁻³) del etanol obtenido en la etapa de la destilación.	107
3.3.	Determinación del pH para el etanol obtenido en la etapa de la destilación.	108
3.4.	Determinación de alcoholes superiores (ppm) obtenidos en la etapa de la destilación.	108
3.5.	Determinación de aldehídos (ppm Furfural) obtenidos en la etapa de la destilación.	109
3.6.	Datos del Gasto de hidróxido de sodio (mL) en soluciones alcohólicas obtenidas como producto.	109
3.7.	Datos de la Acidez Total (mg Ácido Acético /L Alcohol Anhidro) del etanol obtenido como producto.	110
3.8.	Determinación de esterres (ppm Acetato de etilo) obtenidos en la etapa de la destilación.	110
3.9.	Determinación de Metanol (ppm) obtenidos en la etapa de la destilación.	111
3.10.	Presupuesto de investigación	112

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Demirbas A. (2008), reporta que los combustibles fósiles representan arriba del 80% del abastecimiento energético total en el mundo. Pero actualmente, el mundo está en crisis de materias primas, particularmente hablando, el sector energético se desenvuelve en la explotación de recursos no renovables y por lo tanto finitos. **Alfaro A, Rivera A, y col. (2009)**, menciona por otro lado, la producción mundial de la biomasa se estima sea de 146 billones de toneladas métricas que comprende en su mayoría el crecimiento de plantas silvestres y 10 a 50 billones en base seca, además en la misma referencia se describe que la biomasa esta en cuarto lugar como fuente de energía y proporciona el 14% de la energía que el mundo necesita. Estos subproductos o residuos en su mayoría corresponden a biomasa lignocelulósica rica en polímeros de celulosa y hemicelulosa entre 75-80%, los cuales pese a su dificultosa degradación, es posible mediante procesos químicos, físicos y/o biológicos desdoblarlos a azúcares monosacáridos para su conversión a etanol.

El Sorgo Dulce (*Sorghum bicolor* Var. *Sugar Drip*), considerado como “el camello” de los cultivos es conocido en el Perú desde 1929, iniciando en el año de 1952 las primeras evaluaciones en nuestro país. Caracterizado por su alta capacidad fotosintética permite obtener tallos frondosos con abundante jugo y alta concentración azúcares necesarios para obtener etanol, capacidad de adaptación, resistencia a las sequías, a suelos Alcalinos – Salinos, y tolerancia a la inundación. La existencia de tierras con problemas de desertificación y sequía (768 mil ha.), deforestadas (706 mil ha) y salinización (62 mil ha) según la Comisión Departamental de Piura.

Una elevada concentración de etanol en el flujo de los productos, así como un rendimiento y velocidad de producción elevados alcanzado usando la bacteria *Zymomonas mobilis* así como capacidad para la conversión de 1 mol de glucosa a 2 moles de etanol y 2 moles de CO₂ hace a este microorganismo un importante factor en la producción de etanol con proporciones significativamente más altas de captación de azúcares y producción de etanol en comparación a aquellos encontrados para las levaduras (**Krieg, 1971**).

La biomasa lignocelulósica utilizada está compuesta de Hemicelulosa, Celulosa y Lignina. Asimismo forma parte integral de las estrategias de desarrollo rural, de

mitigación de la pobreza, de fortalecimiento de la seguridad alimentaria y centrarse en la maximización de la eficiencia y eficacia de la producción de bioetanol.

Para ejecutar esta tarea, la hidrólisis utiliza tecnologías complejas, en base al uso de vías ácidas y/o enzimáticas para la separación de los azúcares y remoción de la lignina. Hay una gran influencia de la composición y de la estructura de la materia prima sobre el desempeño de los procesos, siendo relevantes las fases iniciales de preparación y pre-tratamiento. Son igualmente importantes los procesos de fermentación, poco desarrollados aún. Aunque la hidrólisis con ácido diluido esté en una etapa de perfeccionamiento más avanzado que las demás vías, la hidrólisis enzimática tiene más viabilidad y concentra actualmente mayor atención, en especial en los procesos con sacarificación y fermentación simultáneas.

Bajo esta línea de investigación, se desarrolló el proyecto de tesis titulado “Producción de biocombustible a partir de biomasa lignocelulósica de Sorgo Dulce (*Sorghum bicolor* Var. Sugar Drip) por extracción con vapor”. Cuyo objetivo general fue determinar el nivel de producción de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica de Sorgo Dulce (*Sorghum bicolor* Var. Sugar Drip) por extracción con vapor; y de manera específica:

- Caracterizar la biomasa lignocelulósica del cultivo de Sorgo Dulce.
- Determinar la concentración de sólidos (expresado en grados brix), el pH, acidez titulable y temperatura de operación.
- Determinar la máxima concentración de fermentación y comparar sus rendimientos de producción bioetanol respecto al sustrato consumido.
- Determinar el nivel de producción de impurezas producidas.
- Caracterizar bioetanol obtenido a partir de la biomasa lignocelulósica del cultivo de Sorgo Dulce.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO.

2.1. Sorgo dulce (*sorghum bicolor* var. sugar drip)

El sorgo dulce [*Sorghum bicolor* var. Sugar drip] es una planta tolerante a la sequía, altas temperaturas, inundaciones, salinidad del suelo y toxicidad por acidez (Almodares y Hadi, 2009). Además, posee amplia adaptabilidad, rápido crecimiento y alta acumulación de azúcar. Es la principal materia prima alternativa que puede suplementar el uso de la caña de azúcar en la producción de etanol. El sorgo dulce es nativo de África y muchas de las variedades conocidas actualmente han sido generadas en ese continente. Se cree que antes de que la historia lo registrara fue producido en la India y en Asiria desde 700 años a.C. Su cultivo llegó a China durante el siglo XIII y posteriormente llegó al hemisferio occidental. El sorgo dulce fue introducido a los Estados Unidos de América después del siglo XVII, sin embargo, no creció extensivamente en este país hasta 1850, cuando fue introducido de Francia. Desde entonces, muchas otras variedades se han introducido de otros países o se han desarrollado en este país.

El sorgo dulce es un cultivo que no compite con los granos, ya que puede sembrarse en áreas no aptas para otros cultivos y ofrece en algunos casos grano y forraje, siendo el tallo el principal órgano que se aprovecha, el cual presenta un alto contenido de azúcar (Almodares y Hadi, 2009).

El sorgo dulce puede ser transformado biológicamente en alcohol etílico de primera generación, etanol celulósico o para producir energía propia (Parrish, 2009).

El sorgo es una especie rústica que puede ser cultivado en una gran variedad de ambientes y tipos de suelos. Se destaca por su mayor adaptación y mejor respuesta en condiciones edafoclimáticas limitantes, dando estabilidad de rendimientos en situaciones productivas de menor potencialidad, donde el maíz no responde. Es tolerante a deficiencias hídricas: requiere aproximadamente un tercio del agua para la producción de grano o biomasa comparado con el maíz o la caña de azúcar. Además, se adapta a suelos salinos y arenosos y es un excelente recuperador de suelos, dando un balance positivo del carbono, preservando la estructura física del suelo. A su vez, puede producir satisfactoriamente aún con bajo nivel de fertilidad, adaptándose a ambientes marginales. Otra gran ventaja es que

completa su ciclo en 3 a 5 meses, dependiendo del grupo taxonómico (granífero/azucarado), generalmente en 4 meses, lo que permite su uso en un esquema de rotaciones con otros cultivos anuales. Además, en general, no compite en superficie con otras especies para alimento humano.

2.1.1. Composición química de la biomasa lignocelulosa de sorgo dulce

- Celulosa ($C_6H_{10}O_5$): 15 – 25%
- Hemicelulosa ($C_5H_{10}O_5$): 35 – 50%
- Lignina: 20 – 30%

2.1.2. Importancia del sorgo dulce

En la actualidad se está promocionando su cultivo por su alta capacidad fotosintética que permite obtener tallos frondosos con abundante jugo y alta concentración de azúcar de la que se puede obtener lignocelulosa, piloncillo o destilarse para producir alcohol etílico y etanol para disminuir el uso de los hidrocarburos que cada día incrementan la contaminación del medio ambiente.

Hoy en día constituye una de las principales gramíneas forrajeras que contribuyen a solucionar el problema que atraviesa la actividad ganadera en lo que se refiere al autoabastecimiento de forrajes.

El sorgo dulce o azucarado se ha considerado como el camello de los cultivos por su gran capacidad de adaptación, su resistencia a las sequías, a los suelos alcalinos –salinos y su tolerancia a la inundación. Además requiere tan solo un tercio del agua que consume la caña de azúcar, su periodo de crecimiento es bastante corto para permitir cosecharlo cuatro veces al año; además, la caña de azúcar se propaga por estaquillas del tallo, mientras que del sorgo se siembran las semillas y basta con 4.5 kg/ha en comparación con las 4500-6000 estaquillas de caña de azúcar.

Según FAO (2004), el potencial del sorgo azucarado como cultivo para obtener energía, llega a producir hasta 7000 litros de alcohol etílico por hectárea. Asimismo el sorgo dulce requiere tan solo un tercio del agua que consume la caña de azúcar su periodo de crecimiento cuatro veces al año, además la caña de azúcar se propaga por estaquillas del tallo, del sorgo se siembran las semillas y basta con 4.5 Kg/ha en comparación con las 4 500 – 6 000 estaquillas de caña de azúcar.

2.2.Biomasa lignocelulósica como materia prima para la producción de etanol

2.2.1. Fuente de biomasa

Ballesteros (2002), menciona que bajo el término biomasa se incluye toda la materia orgánica que tiene su origen inmediato en un proceso biológico. La formación de biomasa vegetal a partir de luz solar se lleva a cabo mediante la fotosíntesis, gracias a la cual se forman moléculas de alto contenido energético en forma de energía química. La producción de biomasa a escala global en el planeta es muy alta, estimándose que la fotosíntesis fija anualmente $2,2 \times 10^{11}$ toneladas de peso seco de biomasa, lo que supone unas diez veces la demanda energética mundial. Atendiendo a su origen, la biomasa se puede clasificar en:

- Biomasa natural, producida en los ecosistemas naturales.
- Biomasa residual, generada como residuo en los procesos productivos de los sectores agrícola, forestal e industrial.
- Cultivos energéticos, son aquellos dedicados a la producción de biomasa para su utilización energética con fines no alimentarios

2.2.2. Composición y estructura de la biomasa lignocelulósica

Los materiales lignocelulósicos tienen tres componentes fundamentales, los polisacáridos, la lignina y otras sustancias que no forman parte de la pared celular.

2.2.2.1. Polisacáridos

El componente polisacárido comprende carbohidratos de alto peso molecular (celulosa y hemicelulosa), que representan entre el 60-80% del total de los materiales lignocelulósicos

A. Celulosa.

La celulosa, componente mayoritario de las paredes celulares de las fibras de madera, es un polímero lineal de β -D-Glucosa con un peso molecular de aproximadamente 500.000. Las moléculas individuales de glucosa están unidas por enlaces β -(1,4), según se muestra en la **figura 1.1**. El número de azúcares de cadena (grado de polimerización G.P.), varía en los diferentes materiales celulósicos.

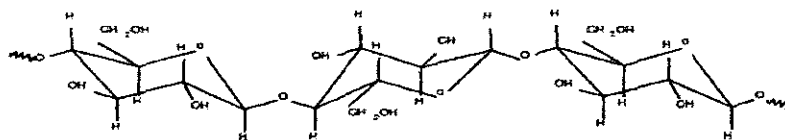


Figura 1.1. Estructura primaria de la celulosa.

El anillo de piranosa está en conformación $4C_1$, es decir, que los grupos $-CH_2OH$ y $-OH$, así como los enlaces glucosídicos, están en posición ecuatorial con respecto al plano medio del anillo, y los átomos de hidrógeno en posición axial.

B. Hemicelulosa.

Las hemicelulosas están constituidas por polímeros de unidades de anhidroazúcares unidas por enlaces glucosídicos, formadas por más de un tipo de azúcar (hexosas o pentosas), y además presentan ramificaciones y sustituciones. Su papel es suministrar la unión entre la lignina y la celulosa. En estado natural existe en forma amorfa con un grado de polimerización que no excede de 200 (G.P.). Existen dos tipos de hemicelulosas que se encuentran tanto en las maderas duras como en las blandas: los xilanos y los glucomananos. En las maderas duras, las hemicelulosas predominantes son los xilanos, un polímero de unidades de β -xilopiranosas unidas por enlaces β -(1,4), que presenta ligeras ramificaciones. En los xilanos los grupos hidroxilo pueden estar sustituidos por grupos 4- O-metilglucurónico unidos por enlaces α -(1,2), y por grupos acetilo unidos por enlaces éster a posiciones 2 y 3 del anillo de pentosa (**Figura 1.2.**).

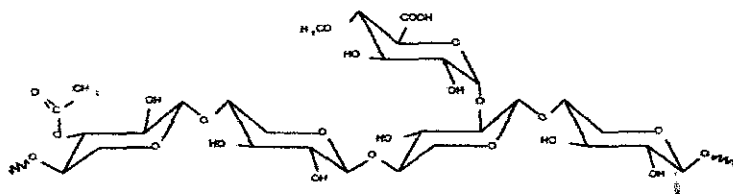


Figura 1.2. Estructura del O-acetil-4-O-metilglucuronoxilano.

Los glucomananos de maderas duras son polímeros lineales de glucosa y manosa unidos por enlaces β -(1,4), con predominio de las manosas, y que no presentan ramificaciones ni grupos sustituyentes laterales (**figura 1.3.**).

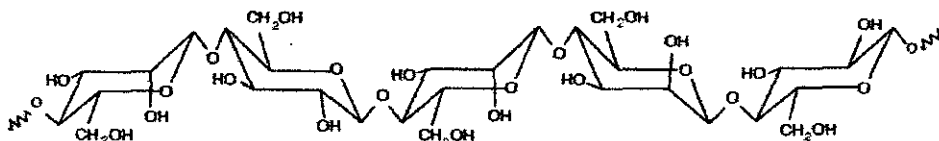


Figura 1.3. Estructura del glucomanano.

En los xilanos de maderas blandas el esqueleto del polímero es idéntico al de maderas duras, los sustituyentes son los grupos 4-O-metilglucurónico, unidos por enlaces α -(1,2) y restos de arabinosa unidas por enlaces α -(1,3) (figura 1.4).

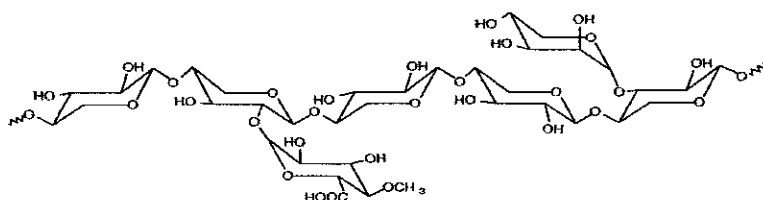


Figura 1.4. Estructura del arabino-4-O-metilglucuronoxilano.

Los glucomananos de maderas blandas, con mayor cantidad de manosa que los de maderas duras, tienen dos tipos de sustituyentes; los grupos O-acetil unidos por enlaces éster a las posiciones 2 y 3 del esqueleto del azúcar; y la galactosa unida por enlaces α -(1,6). Estos glucomananos se denominan galactoglucomananos (figura 1.5).

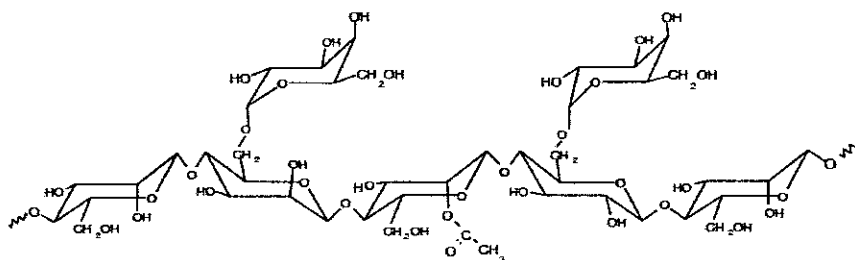


Figura 1.5. Estructura del O-acetil-galactoglucomanano.

2.2.2.2. Lignina

Es la tercera fracción mayoritaria de la biomasa lignocelulósica. Se trata de un polímero tridimensional amorfo formado por la polimerización deshidrogenativa de unidades de fenilpropano ligadas por diferentes tipos de enlaces que se alternan de manera desordenada (figura 1.6). Los monómeros que forman la lignina son los denominados alcoholes cinamílicos (figura 1.7), diferenciados entre sí por las diferentes sustituciones que presenta el anillo aromático. Así, el alcohol p-cumarílico que da lugar a las unidades p-hidroxifenilo (unidades H) no presenta ningún sustituyente; el alcohol coniferílico que da lugar a las unidades guayacilo (unidades G) presenta un grupo metoxilo en la posición 3 del anillo aromático y el alcohol sinapílico que da lugar a las unidades siringilo (unidades S) presenta dos grupos metoxilo en posiciones 3 y 5 de dicho anillo.

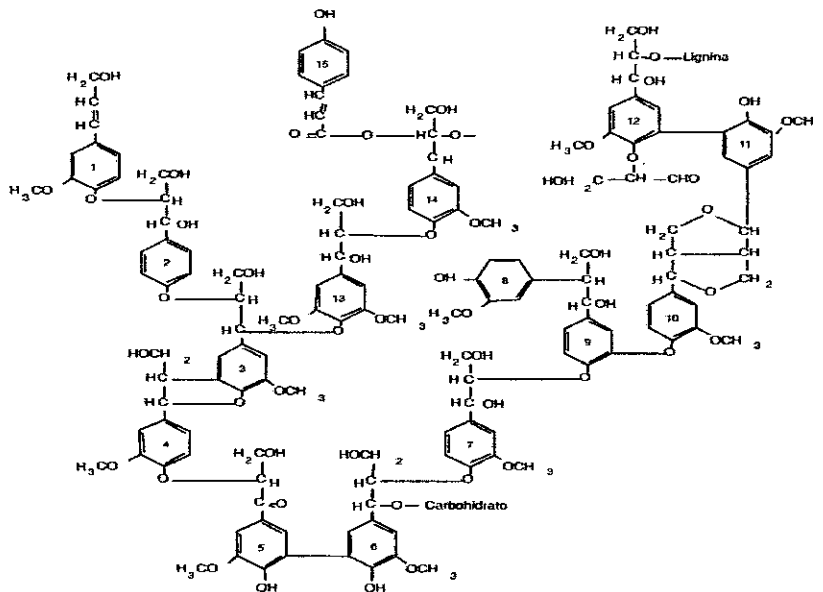


Figura 1.6. Estructura de la lignina.

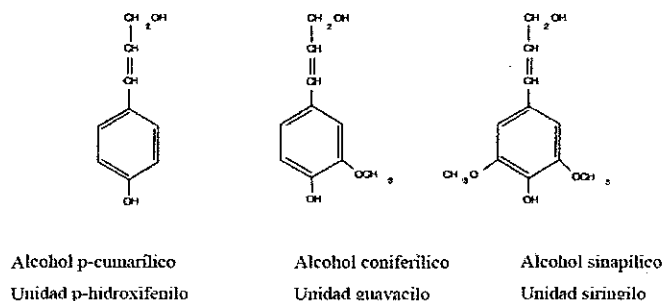


Figura 1.7. Alcoholes cinamílicos precursores de la lignina

La proporción de las tres unidades que forman la lignina y el tipo de enlace difiere según el tipo de planta, así como del grupo taxonómico, tejido o capa de la pared celular, estado de desarrollo y condiciones ambientales. Así, se puede hacer una diferenciación de la lignina dependiendo del grupo taxonómico. La lignina de gimnospermas (maderas blandas), está formada mayoritariamente por unidades de tipo guayacilo, mientras que la lignina de las angiospermas leñosas (maderas duras) está formada por unidades guayacilo y siringilo. Esta alta proporción de unidades derivadas del alcohol sinapílico en las maderas duras determina la estructura y características de este tipo de lignina, ya que la presencia de los dos grupos metoxilo en posiciones 3 y 5 del anillo aromático reduce la formación de enlaces tipo éter y sobre todo los enlaces C-C, lo que se traduce en una reducción del grado de polimerización y en un menor grado de condensación. De esta forma las maderas duras son más fáciles de deslignificar que las maderas blandas.

2.2.2.3. Otras sustancias

No forman parte de la estructura de la pared vegetal, y la mayoría son solubles en solventes neutros. Los componentes solubles en solventes neutros, representan entre el 4-10% del peso seco de la madera. Hay una gran variedad de compuestos orgánicos, grasas, ceras, alcaloides, proteínas, fenoles simples y complejos, azúcares simples, pectinas, mucílagos, gomas, resinas, terpenos, etc. Actúan como intermediarios metabólicos, reserva de energía o parte de los mecanismos de defensa contra los ataques microbianos. Contribuyen al color, olor y resistencia al marchitamiento.

Cuadro 1.1. Composición de celulosa, hemicelulosa y lignina en residuos agrícolas, forestales y desechos. SUN, Y; CHENG, J. (2002)

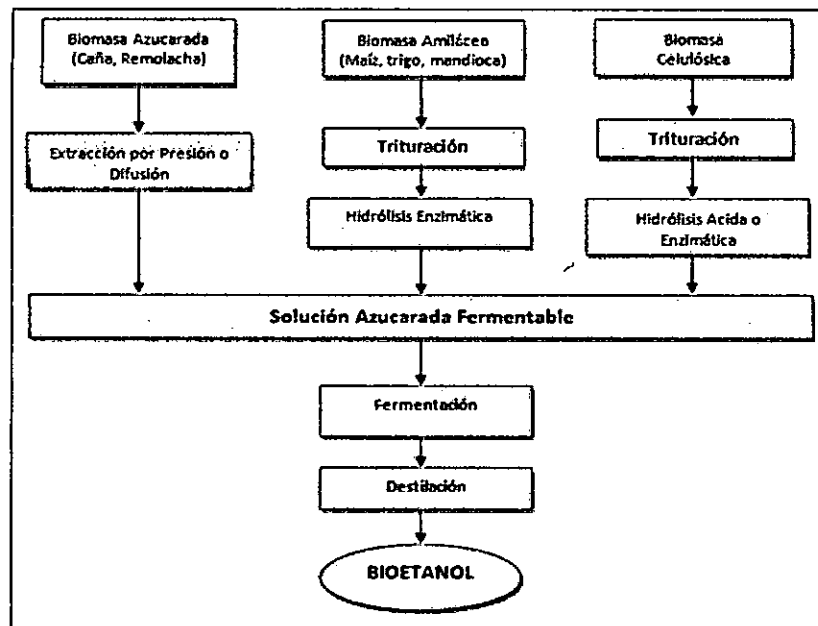
Material Lignocelulósico	Celulosa [%]	Hemicelulosa [%]	Lignina [%]
Tallos de maderas duras	40-55	24-40	18-25
Tallos de maderas blandas	45-50	25-35	25-35
Mazorca de maíz	45	35	15
Paja de arroz	32,1	24	18
Bagazo	33,4	30	18,9
Paja de trigo	30	50	15
Hojas	15-20	80-85	0
Pasto	45	31,4	12
Papel	85-99	0	0-15
Hojas	15-20	20	20
Papel de diario	40-55	25-40	18-30
Papel de desecho de pulpas químicas	60-70	10-20	5-10
Sólidos primarios de aguas de desecho	8-15	N/A	24-29
Desechos de puercos	6	28	N/A
Estiércol sólido de ganado	1,6-4,7	1,4-3,3	2,7-5,7

2.3. Producción de etanol por vía enzimática a partir de biomasa lignocelulósica

Para que los polisacáridos de la biomasa lignocelulósica den lugar a azúcares potencialmente fermentables, se debe someter a la biomasa a una etapa de hidrólisis. La hidrólisis de los polisacáridos puede llevarse a cabo con catalizadores ácidos (hidrólisis ácida) o con catalizadores enzimáticos (hidrólisis enzimática). La hidrólisis ácida puede realizarse mediante un ácido concentrado o un ácido diluido. A utilizar ácidos concentrados, la gran cantidad de ácido empleada, lo costoso de su recuperación y la necesaria neutralización del medio antes de la fermentación unida a los efectos corrosivos de los ácidos hacen que el proceso no sea rentable económicamente. Si se emplean ácidos diluidos se requieren temperaturas relativamente altas que provocan una mayor corrosión de los equipos y mayor degradación de los azúcares hemicelulósicos. Es por ello que, los

procesos de producción de etanol basados en hidrólisis enzimática (HE) son los que se muestran como opciones más prometedoras. El proceso de producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica basado en la HE consta básicamente de las siguientes etapas: pretratamiento, HE, fermentación y destilación (**figura 1.8.**). Estas etapas pueden llevarse a cabo mediante distintas configuraciones de proceso o diferentes niveles de integración como será discutido más adelante.

Figura1.8. Rutas tecnológicas para la obtención de bioetanol



2.3.1. Pretratamiento

Cuando en la etapa de hidrólisis de la celulosa se emplean catalizadores enzimáticos, debido a las características estructurales de los materiales lignocelulósicos antes mencionadas, el pretratamiento es una etapa crucial. La incubación de materiales celulósicos de forma natural en presencia de preparaciones de celulasas resulta generalmente en unos rendimientos de HE inferiores al 20%, debido a que la fuerte asociación de la celulosa con la lignina constituye una verdadera barrera física a la penetración de las enzimas (Lynd y col., 2002).

Un pretratamiento efectivo debe dissociar el revestimiento que la lignina y la hemicelulosa forman alrededor de la celulosa con el fin de aumentar la accesibilidad de ésta a las enzimas, debe alterar las características estructurales de la celulosa, tales como la cristalinidad o el grado de polimerización, y provocar la solubilización y/o redistribución

de la lignina **(Wyman y col., 2005)**. Existen diferentes tecnologías de pretratamiento de la biomasa lignocelulósica, que pueden ser clasificadas según su naturaleza en pretratamientos físicos, químicos, biológicos y físico-químicos **(Sun y Cheng, 2002)**.

Dentro de los pretratamientos físicos se engloba la molienda que utiliza fuerzas de impacto y cizalla para disminuir la cristalinidad de la celulosa **(Sánchez y Cardona, 2008)**. Los requerimientos energéticos en este tipo de pretratamientos dependen del tamaño final de partícula que se quiera alcanzar y de la materia prima a pretratar, pero en todos los casos supone altos costes energéticos y de capital.

Los pretratamientos químicos emplean diferentes agentes como el ozono, ácidos, álcalis, peróxido y solventes orgánicos. Entre los diferentes pretratamientos químicos, el pretratamiento con ácido diluido ha sido el más estudiado y mejora significativamente la hidrólisis enzimática **(Saha y col., 2005)**.

Los pretratamientos biológicos implican el uso de microorganismos como los hongos de la podredumbre blanca, parda o blanda, capaces de degradar la lignina y hemicelulosa **(Cardona y Sánchez, 2007)**. El principal inconveniente es que dichos hongos también consumen celulosa, lo que supone un problema para el rendimiento total del proceso **(Sun y Cheng, 2002)**. Además, la lentitud a la que se desarrollan estos procesos supone una desventaja adicional. Entre los pretratamientos físico-químicos la explosión por vapor (EV) ha sido el pretratamiento más ampliamente utilizado para biomasa lignocelulósica **(Ballesteros y col, 2006)**.

Junto a la EV, el pretratamiento con agua caliente en fase líquida (ACL) y la explosión por vapor con amoníaco (AFEX, del inglés “amonia fiber explosion”) también se muestran como pretratamientos físico-químicos eficientes para la biomasa lignocelulósica **(Pérez y col., 2007)**. El ACL consiste en someter a la biomasa a agua caliente en estado líquido y alta presión durante un periodo determinado de tiempo **(Pérez y col., 2007)**. Con este pretratamiento se obtiene una gran recuperación de los azúcares hemicelulósicos y se generan concentraciones bajas de productos de degradación **(Hendriks y Zeeman, 2009)**.

El pretratamiento AFEX es similar a la EV. La biomasa se impregna con amoníaco a alta presión y el pretratamiento se realiza a temperaturas por debajo de 100°C **(Mosier y col., 2005)**. El material se somete a una rápida descompresión, lo que modifica la estructura de

la lignina, favoreciendo la accesibilidad de las enzimas a la celulosa. Este pretratamiento ha sido empleado con éxito con materiales herbáceos, sin embargo, no se obtienen demasiado buenos rendimientos con maderas duras y no es adecuado para las maderas blandas.

De entre todos los pretratamientos mencionados, los físicos como la molienda, los químicos como la ozonólisis y los biológicos, no parecen adecuados para su desarrollo a escala comercial debido su elevado coste energético. Sin embargo, la EV, el ACL, el pretratamiento con ácido diluido y el AFEX se consideran pretratamientos con potencial para su implementación a escala comercial (Mosier y col., 2005).

2.3.1.1. Pretratamiento de explosión por vapor

El pretratamiento por explosión por vapor (EV) es un pretratamiento hidrotérmico en el que la biomasa es sometida a la acción de vapor saturado a relativamente alta presión durante un periodo determinado de tiempo (que puede variar desde unos segundos a varios minutos) tras el cual, el reactor se somete a una brusca descompresión. La EV combina efectos mecánicos con efectos químicos. Los efectos mecánicos están causados por la rápida despresurización que provoca una evaporación del agua interna, creando fuerzas de cizalladura que producen separación de las fibras, principalmente en las zonas de celulosa amorfa más débiles. El efecto químico se debe a que algunos grupos acetilos de las hemicelulosas son hidrolizados produciendo ácido acético, éste disminuye ligeramente el pH del agua y a la temperatura del proceso, cataliza la hidrólisis de la hemicelulosa (autohidrólisis). Durante la EV la lignina es redistribuida y parcialmente solubilizada (Palonen, 2004). Estudios recientes han concluido que la solubilización parcial de la hemicelulosa y la redistribución de la lignina son efectos, incluso más importantes que la ruptura de las fibras o modificación de la cristalinidad de la celulosa, para el aumento de la digestibilidad durante la hidrólisis (Kristensen y col., 2008).

La EV se ha mostrado como un método de pretratamiento adecuado para aumentar la accesibilidad de la celulosa al ataque enzimático para un amplio rango de materias primas como chopo (Oliva y col., 2003), eucalipto (Ramos y col., 1992), ramón de olivo (Cara y col., 2006), bagazo de maíz (Öhgren y col., 2006), bagazo de caña de azúcar (Glasser y Wright, 1998) y paja de trigo (Ballesteros y col., 2006). Sin embargo, este pretratamiento se muestra menos eficaz con las maderas blandas debido a

su mayor contenido en lignina y menor número de grupos acetilo, lo que provoca que el proceso de autohidrólisis no sea tan efectivo. En el caso de las maderas blandas es necesario añadir un catalizador ácido, lo que implica mayor generación de productos tóxicos.

Los factores que afectan en mayor medida la efectividad del pretratamiento de EV son el tamaño de partícula del material a pretratar, la temperatura y el tiempo de residencia. El efecto de la combinación de estos dos últimos puede expresarse con el factor de severidad (Ro), siendo los valores entre 3,0 y 4,5 los óptimos para la recuperación de azúcares en un proceso de EV (Alfani y col., 2000).

Entre las ventajas del pretratamiento EV, cabe destacar la posibilidad de emplear tamaños relativamente grandes de partícula, evitar la adición de catalizadores ácidos (a excepción de las maderas blandas), la alta recuperación de azúcares, buenos rendimientos en la posterior HE y su viabilidad para ser implementado a escala comercial. No obstante, entre sus limitaciones se encuentran la parcial degradación de los azúcares hemicelulósicos y la generación de compuestos tóxicos que son potencialmente inhibidores de las etapas posteriores de hidrólisis y fermentación.

2.3.1.2. Compuestos tóxicos generados en el pretratamiento

Cuando los materiales lignocelulósicos se someten a condiciones severas durante el pretratamiento (alta temperatura, alta presión, ambiente ácido) puede darse cierta degradación de la lignina y de los azúcares, ya sean hemicelulósicos o celulósicos, generándose productos tóxicos que pueden afectar las siguientes etapas de hidrólisis y fermentación.

Atendiendo a su origen, los compuestos de degradación pueden dividirse en tres grupos (**figura 1.9.**): derivados del furano, ácidos alifáticos de bajo peso molecular y derivados fenólicos (Larsson y col., 2000). Los principales derivados del furano son el furfural y el 5-hidroximetilfurfural (HMF) que provienen de la degradación de las pentosas y hexosas, respectivamente.

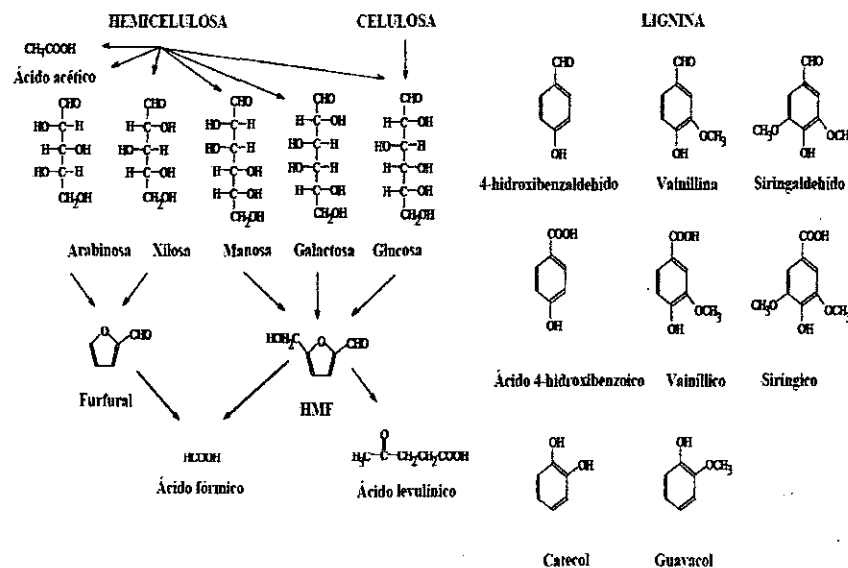


Figura 1.9. Principales productos de degradación originados en el pretratamiento de la biomasa lignocelulósica.

Los ácidos alifáticos generados durante el pretratamiento son principalmente el ácido acético, producido a partir de los restos acetilo de las hemicelulosas, y el ácido fórmico, procedente de la degradación del furfural e HMF (Almeida y col., 2007).

También se generan durante el pretratamiento un amplio rango de compuestos fenólicos como consecuencia de la solubilización de la lignina. Los derivados fenólicos más abundantes son el 4- vainillina, siringaldehído, hidroxibenzaldehído, ácido vainílico, acetosiringona y ácido siringico (Klinke y col., 2002).

2.3.1.3. Efectos de los compuestos tóxicos sobre los microorganismos

A. Furfural e hidroximetilfurfural (HMF).

Entre los efectos producidos por el furfural sobre los microorganismos citados en la bibliografía se encuentran: reducción de la tasa específica de crecimiento (Azhar y col., 1981); disminución de la productividad volumétrica de etanol; descenso de la productividad específica de etanol (Palmqvist col., 1999b; Taherzadeh y col., 2000b) y disminución de la producción de biomasa (Palmqvist y col., 1999b).

B. Ácidos alifáticos.

Uno de los mecanismos propuesto para explicar el efecto inhibitorio de los ácidos alifáticos es la teoría del desacoplamiento. Según esta, el efecto tóxico depende del pKa

de los ácidos y del pH del medio. Aunque no se conoce con certeza el mecanismo de inhibición de los ácidos alifáticos, el efecto tóxico mostrado por estos compuestos puede deberse tanto al desacoplamiento como al efecto inhibitorio de la acumulación de aniones. (Palmqvist y col., 1998).

2.3.2. Hidrólisis enzimática

Como se ha comentado anteriormente, la primera etapa en el proceso de producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica es el pretratamiento. El material insoluble obtenido tras el pretratamiento de EV está formado principalmente por celulosa y lignina, ya que gran parte los azúcares hemicelulósicos son solubilizados durante el mismo. Con el fin de romper las cadenas de celulosa en monómeros de glucosa, se emplean diversas enzimas que se conocen con el nombre de celulasas.

La hidrólisis enzimática (HE) constituye una de las etapas limitantes del proceso global de producción de etanol. Las principales dificultades al realizar la HE de la biomasa lignocelulósica están relacionadas con la baja actividad específica de las enzimas actualmente disponibles, lo que conlleva el empleo de altas dosis de celulasas, y con la propia naturaleza de la lignocelulosa. Es por este último inconveniente que el pretratamiento es una etapa crucial en los procesos de producción de etanol mediante HE. Además, el coste de producción enzimática representa una parte significativa del coste total del proceso. En un proceso de producción de etanol mediante sacarificación y fermentación simultáneas (SFS), la producción enzimática puede llegar a constituir el 50% del coste total (Galbe y Zacchi, 2002).

Un amplio rango de microorganismos, entre los que se encuentran bacterias y hongos, son productores de celulasas, pero sólo un pequeño número de éstos son capaces de producirlas en grandes cantidades. Algunas de las bacterias celulolíticas más estudiadas pertenecen al grupo *Cellulomonas*, *Thermobifida*, y *Clostridium* (Lynd y col., 2002) algunos géneros de hongos como *Phanerochaete*, *Fusarium* y *Trichoderma* y algunas especies de *Aspergillus*, *Penicillium* y *Shizophyllum*, ya que producen celulasas en grandes cantidades y de forma extracelular lo que facilita su recuperación del medio de cultivo.

La mayoría de los microorganismos productores de celulasas producen también, aunque en menor medida, hemicelulasas. No obstante, existen microorganismos que las producen

en cantidades mayores, tales como: *Escherichia coli*, *Pichia stipitis*, *Zymomonas mobilis* y *Thermoanaerobacter mathranii*. Debido a la naturaleza diversa de la hemicelulosa, las hemicelulasas incluyen un mayor número de grupos de enzimas con actividades enzimáticas específicas para cada tipo de enlace. Incluyen enzimas que rompen la cadena principal, como las xilanasas y las β -xilosidasas, y enzimas que rompen las ramificaciones como las α -L-arabinofuranosidasas, acetixilanoesterasas, α -D-glucuronosidasas, ferúlicoesterasas y β -galactosidasas (Saha, 2003).

2.3.3. Fermentación

La fermentación alcohólica es un proceso ampliamente utilizado por el hombre desde hace miles de años para la producción de bebidas alcohólicas como el vino o la cerveza. Cuando la fermentación se emplea en el proceso de producción de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica, los azúcares liberados durante la hidrólisis enzimática son fermentados con la consiguiente producción de etanol y CO_2 . La conversión estequiométrica de la glucosa y xilosa a etanol es de 0,51 gramos de etanol por gramo de azúcar. En la práctica es muy difícil obtener conversiones tan altas ya que las levaduras derivan cierta parte de la energía que consumen hacia el metabolismo celular y el crecimiento.

El microorganismo comúnmente empleado a nivel industrial en los procesos de fermentación alcohólica es la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, ya que puede usar todo tipo de hexosas y produce etanol con unos rendimientos cercanos al máximo teórico (0,51 g/g). Además, si se emplea en procesos de producción de etanol a partir de lignocelulosa, muestra gran tolerancia a los productos tóxicos generados durante el pretratamiento. No obstante, *S. cerevisiae* presenta una gran limitación cuando se quiere utilizar en la fermentación de los azúcares hemicelulósicos ya que no es capaz de fermentar pentosas, como la xilosa, que también están presentes en los materiales lignocelulósicos. La fermentación de las pentosas, la obtención de altos rendimientos a etanol y altas productividades no son las únicas características a tener en cuenta en la elección del microorganismo para un proceso de producción de etanol a partir de lignocelulosa. El microorganismo empleado debe ser también capaz de tolerar los posibles tóxicos generados durante el pretratamiento.

2.3.4.1. Fermentación de la xilosa

Los residuos agrícolas, entre los que se encuentra la paja de Sorgo dulce, contienen alrededor de un 25% de azúcares hemicelulósicos, principalmente xilosa. Es por ello que la utilización de la xilosa es esencial para una eficiente y rentable conversión de la biomasa lignocelulósica a etanol. Mientras la fermentación de la glucosa puede llevarse a cabo de forma eficiente por numerosos tipos de microorganismos, la fermentación de la xilosa presenta algunas limitaciones. Únicamente bacterias entéricas y algunas levaduras como *Candidashehatae*, *Pachysolentannophilus* y *P. stipitis* son capaces de fermentar la xilosa a etanol como se muestra en la **figura 1.10.**, pero con rendimientos relativamente bajos. Además, las levaduras fermentadoras de xilosa no toleran altas concentraciones de etanol, requieren condiciones microaerófilas para su crecimiento y son muy sensibles a los inhibidores y a los cambios de pH (Hahn-Hägerdal 1994).

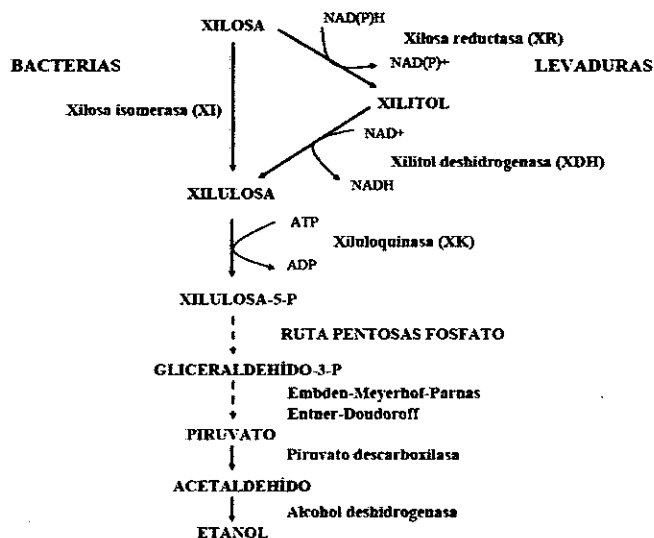


Figura 1.10. Diferentes rutas de la fermentación de la xilosa en bacterias o levaduras fermentadoras de xilosa.

Las bacterias que se han mostrado más prometedoras para su utilización a escala industrial son *E. coli*, *Z. mobilis* y *Klebsiella oxytoca*. *E. coli* puede crecer sobre numerosas fuentes de carbono y presenta una elevada tolerancia al etanol. No obstante, las cepas salvajes muestran rendimientos bajos de etanol y convierten los azúcares de forma más eficiente a ácido acético o láctico.

2.4. Integración de las etapas de proceso

Para que el proceso de producción de etanol a partir de lignocelulosa sea eficiente se requiere una completa hidrólisis de los azúcares, tanto celulósicos como hemicelulósicos, y una eficiente fermentación de los azúcares a etanol. Además, el proceso debe realizarse con una baja demanda energética. Para lograr estos objetivos son necesarias altas concentraciones de sólidos iniciales en el medio de fermentación que permitan obtener altas concentraciones finales de etanol, junto con una eficiente integración de las etapas de proceso que permita alcanzar altos rendimientos y baja inversión en equipos.

Con el fin de no tener pérdidas de azúcares potencialmente fermentables, minimizar los volúmenes de agua empleados y reducir los costes de proceso, sería conveniente emplear en las posteriores etapas de hidrólisis y fermentación, el material pretratado completo (MPC) y no únicamente la fracción de RSI (Palmqvist y col., 1997). Al no separar la fracción líquida, además de los azúcares hemicelulósicos solubilizados, también están presentes en el medio los productos de degradación generados durante el pretratamiento. Por ello, es importante utilizar microorganismos con elevada tolerancia a los tóxicos y capaces de fermentar la xilosa de forma eficiente.

2.4.1. Hidrólisis y fermentación separadas

Stenberg y col., (2008), menciona que este proceso, denominado hidrólisis y fermentación separadas, la fracción rica en celulosa es primeramente hidrolizada a glucosa. Una vez completada la hidrólisis y separado el residuo de lignina, la glucosa resultante es fermentada y convertida a etanol. La utilización de un medio líquido rico en glucosa hace posible la recirculación de los microorganismos tras la fermentación.

2.4.2. Sacarificación y fermentación simultáneas

En el proceso de SFS la glucosa liberada por acción de las celulasas durante la hidrólisis es directamente metabolizada a etanol por las levaduras. Esta continua eliminación de la glucosa del medio minimiza la inhibición por producto final sobre la actividad de las celulasas (Olsson y col., 2006) lo que se refleja en rendimientos de hidrólisis más altos, necesidad de menores dosis de enzima, reducción del tiempo total de proceso y productividades de etanol más altas (Ballesteros y col., 2002).

El proceso de SFS se presenta como un método viable y eficiente para la producción de etanol celulósico ya que puede ser empleado con gran variedad de materias primas y con diferentes tecnologías de pretratamiento. No obstante también muestra algunos inconvenientes, ya que las condiciones óptimas de pH y temperatura en las etapas de hidrólisis y fermentación son diferentes y se deben fijar unas condiciones de compromiso entre ambas.

El pH óptimo para la hidrólisis enzimática se encuentra alrededor de 4,8. En cambio, el pH para la fermentación, dependiendo del microorganismo, suele ser 5 o superior. En cuanto a la temperatura óptima, la de la hidrólisis se encuentra alrededor de 50 °C mientras que la mayoría de microorganismos fermentadores tiene su óptimo de temperatura entre los 30-37 °C (Jorgensen y col., 2007). En este contexto, el empleo de levaduras termotolerantes como *Kluyveromyces marxianus* capaces de crecer y fermentar a temperaturas superiores a 40 °C, más cercanas a la temperatura óptima de la hidrólisis, aparece como una alternativa muy prometedora.

2.4.3. Sacarificación y cofermentación simultáneas

Los procesos de SFS se realizan normalmente sobre la fracción del RSI, lo que implica la fermentación mayoritariamente de las hexosas. No obstante, dependiendo del grado de integración del proceso, también puede implicar la fermentación de pentosas cuando se utiliza el MPC (prehidrolizado y RSI) en el proceso de SFS. El empleo del MPC y el uso de levaduras fermentadoras de pentosas darían lugar al proceso denominado sacarificación y cofermentación simultáneas (SCFS).

En un proceso en el que las fracciones sólida y líquida se fermentan por separado, se podrían optimizar las condiciones para la fermentación de la glucosa o xilosa en cada una de ellas. Sin embargo, al emplear el MPC, ambos azúcares están presentes en el medio y deben ser fermentados simultáneamente. Como ha sido mencionado previamente, uno de los pasos limitantes en la utilización de la xilosa por parte de *S. cerevisiae* se ha atribuido al ineficiente transporte de la xilosa al interior de la célula. Xilosa y glucosa comparten transportadores de membrana, pero la afinidad de estos sistemas de transporte por la xilosa es aproximadamente 200 veces menor que para la glucosa (Hamacher y col., 2002). Por consiguiente, la presencia de glucosa en el medio inhibe la incorporación de la xilosa al interior de la célula, por lo que los niveles de glucosa en el medio deben

mantenerse bajos para una cofermentación eficiente (**Chu y Lee, 2007**). Así pues, los procesos en semicontinuo en los que el sustrato se añade por pulsos ayudan a mantener bajas las concentraciones de glucosa a lo largo del proceso de SCFS favoreciendo la incorporación de la xilosa (**Öhgren y col., 2006**).

En el proceso de SCFS la acumulación de glucosa en el medio es menor que en el caso de HFS, ya que según se va produciendo en la etapa de hidrólisis es transformada a etanol por el microorganismo, lo que resulta favorable para la fermentación de la xilosa (**Öhgren y col., 2006**). Además, puesto que los azúcares hemicelulósicos también parecen tener un efecto inhibitorio sobre las celulasas (**Xiao y col., 2004**), el consumo de la xilosa en un proceso de SCFS implicará mayores rendimientos de HE de la celulosa, aumentando aún más la eficiencia global del proceso de SCFS.

2.4.4. Bioproceso consolidado

El bioproceso consolidado (BPC) conlleva la combinación de las 4 reacciones biológicas necesarias para la transformación de la lignocelulosa a etanol en un único reactor: producción de las enzimas (celulasas y hemicelulasas), hidrólisis del material pretratado a azúcares, fermentación de las hexosas y fermentación de las pentosas (**Cardona y Sánchez, 2007**). Para la consecución de dicho proceso se necesita un único microorganismo, o mezcla de éstos, capaces de hidrolizar y fermentar la biomasa pretratada sin adición de enzimas exógenas.

A pesar de todas las ventajas que implicaría la realización de este tipo de BPC, en la actualidad todavía no existen microorganismos con todas las características requeridas para un eficiente BPC.

Cuadro1.2. Descripción de las diferentes configuraciones de proceso con diferentes niveles de integración.

	HFS	SFS	SCFS	BPC
CARACTERÍSTICAS	<ul style="list-style-type: none"> - Las enzimas hidrolizan las cadenas de celulosa a monómeros de glucosa. - La glucosa resultante es convertida a etanol en el paso posterior de fermentación. 	<ul style="list-style-type: none"> - Las enzimas hidrolizan la celulosa y el microorganismo convierte simultáneamente la glucosa resultante a etanol. 	<ul style="list-style-type: none"> - Las enzimas hidrolizan la celulosa y simultáneamente el microorganismo convierte la glucosa resultante a etanol. - La xilosa solubilizada en el hidrolizado es también fermentada a etanol. 	<ul style="list-style-type: none"> - Conversión de los azúcares celulósicos y hemicelulósicos a etanol por un único microorganismo o mezcla de éstos
VENTAJAS	<ul style="list-style-type: none"> - Condiciones óptimas para cada paso. - Posibilidad de reciclaje de las células. 	<ul style="list-style-type: none"> - Amplia disponibilidad de microorganismos eficientes para este tipo de procesos. - Disminución de costes y empleo de menores concentraciones de enzimas. - Se minimiza la inhibición por producto final. 	<ul style="list-style-type: none"> - Aprovechamiento de la mayoría de azúcares presentes en la materia prima. - Disminución de costes y empleo de menores concentraciones de enzimas. - Se minimiza la inhibición por producto final. 	<ul style="list-style-type: none"> - No se necesita la adición de enzimas para realizar la hidrólisis.
DESVENTAJAS	<ul style="list-style-type: none"> - Proceso en dos pasos con el consiguiente aumento de costes que ello supone. - Inhibición por producto final durante la hidrólisis. 	<ul style="list-style-type: none"> - Las condiciones de proceso deben ser un compromiso entre las condiciones óptimas para hidrólisis y fermentación. - Imposibilidad de reciclaje de las células. - No hay fermentación de las pentosas. 	<ul style="list-style-type: none"> - Los microorganismos fermentadores de pentosas no están ampliamente desarrollados. - Las condiciones de proceso deben ser un compromiso entre las condiciones óptimas para hidrólisis y fermentación. - Imposibilidad de reciclaje de las células. 	<ul style="list-style-type: none"> - No existen actualmente microorganismos con todas las características requeridas para un eficiente proceso.

Fuente: Stenberg y col., (2008)

2.5. Destilación

Para Holland (1992) la destilación es una operación unitaria que tiene por objeto separar, mediante vaporización, una mezcla de líquidos miscibles y volátiles en sus componentes. Esta operación se basa en aprovechar las distintas presiones de vapor de los componentes de la mezcla a una cierta temperatura. La destilación puede llevarse a cabo en la práctica por medio de dos métodos principales que son: El primero consiste en la producción de vapor por ebullición de la mezcla líquida que se va a separar en una sola etapa (simple). El segundo implica el retorno de una porción del condensado al destilador (fraccionada).

2.6. Producción nacional y regional de Sorgo dulce

Actualmente en el departamento de Piura se siembra sorgo en pocas cantidades, utilizándose en su mayoría en la alimentación de animales, no existiendo datos estadísticos de producción en la región. Según el ministerio de agricultura y riego (2013) no se ha reportado ningún dato para el año 2012 en cuanto a producción de sorgo dulce y esto debido a que solo ha sobresalido la producción de sorgo grano.

2.7. Subproducto de la destilación.

2.7.1. Anhídrido carbónico.

Para Villanueva, (1997), este subproducto proveniente de la fermentación tiene un alto grado de pureza (99.5%). Cuando el gas emerge del sustrato en la fermentación arrastra trozos de sólidos, alcoholes, aldehídos y esterres. En las fábricas de azúcar es usado para la producción de azúcar refinado. Durante la fermentación de 100 kg de azúcar se produce 46kg de alcohol y 44 de CO₂.

2.7.2. Vinaza

Según Villanueva (1997), la vinaza es el residuo que queda después de extraído el alcohol, sirven para abonar los campos de cultivo. La composición de la vinaza se presenta en **cuadro 1.3**.

Cuadro1.3. Principales componentes de la vinaza.

Componente	%
Agua	93.79
Sulfato	0.63
Fósforo	0.01
Nitrógeno	0.10
Potasio	0.76
Calcio	0.06
Materia orgánica	3.50

Fuente: Villanueva (1997)

2.7.3. Aceite fusel (fusel oil)

Según Villanueva (1997), el aceite fusel es una capa aceitosa que se obtiene al final de la fermentación de los diferentes sustratos con levadura y después de destilado el alcohol etílico. El aceite fusel, es una fracción de alto punto de ebullición (90°C a 150°C) y está formado por algunos componentes del **cuadro1.4.** a partir de diferentes sustratos comestibles.

Cuadro 1.4. Principales componentes del aceite fusel obtenido a partir de diferentes sustratos.

Componente	Aceite fusel de patatas (%)	Aceite fusel de granos (%)	Aceite fusel de melazas azucareras (%)
Alcohol amílico	68.76	79.85	76.0
Alcohol isoamílico	24.35	15.76	6.0
Alcohol n-propílico	6.85	3.69	
Alcohol isopropílico			4.0
Alcohol hexílico		0.15	
Ácidos libres	0.011	0.16	0.5
Ésteres	0.02		2.46
Terpenos		0.081	

Fuente: Krestzschmar, 1961

El fuerte olor residual de aceite de fusel impuro se debe a las trazas de aldehídos, ácidos, ésteres y alcaloides que en este se encuentran.

2.7.4. Congéneres.

Según García G. (1993) estos compuestos son alcoholes, carbonilos, ácidos orgánicos, ésteres y compuestos azufrados, que en conjunto reciben el nombre de congénicos. Si bien la formación de estos compuestos es en general deseable, hay algunos que no lo son y su concentración debe ser lo más baja posible. Dos ejemplos de esta situación son el metanol, alcohol de muy alta toxicidad y el diacetilo el cual confiere a la bebida un sabor desagradable. Los más comunes son: n-propanol, iso-butanol, amílico, acetaldehído, ácido acético, acetato de etilo.

2.8. Impurezas presentes en alcoholes destilados.

2.8.1. Ácidos

Según Hengstebeck (1964), dentro de los ácidos formados en la fermentación alcohólica predomina el acético, y en menores proporciones el sulfuroso y el sulfhídrico.

2.8.2. Aldehídos

Quesada (1996) sostiene que los aldehídos derivan de la oxidación parcial de los alcoholes primarios o de su deshidrogenación.

Cuadro 1.5. Propiedades fisicoquímicas de los aldehídos formados en las fermentaciones industriales.

Aldehído y sinónimos	Fórmula	Pto. De ebullición (°C)	Gravedad específica	Solventes	Presión de vapor (mm Hg a 20°C)
Acetaldehído Sinónimos: Aldehído acético, etanal.	C ₂ H ₄ O	20.2	0.7834	Agua, éter, alcohol, acetona, benceno, tolueno.	740
Acroleína Sinónimos: 2-propenal, n-butilaldehído	C ₃ H ₄ O	52.9	0.8427	Alcohol, éter, agua, acetona.	214
Butiraldehído sinónimos: n – butanal, n – butilaldehído	C ₄ H ₈ O	75.7	0.8048	Agua, éter, Alcohol, acetona, benceno.	91.5
Crotonaldehído Sinónimos: 2 – butanal, Aldehído crotonico	C ₄ H ₆ O	104.0	0.8531	Alcohol, éter, acetona, benceno, tolueno.	30
Paraformaldehído Sinónimos: Triformol, Paraformol.	(CH ₂ O) _n	Dp	1.46	Alcalis fuertes	<2

Fuente : Brabec, 1981.

Cuadro 1.5. Propiedades fisicoquímicas de los aldehídos formados en las fermentaciones industriales.

Aldehído y sinónimos	Fórmula	Pto. De ebullición (°C)	Gravedad específica	Solventes	Presión de vapor (mm Hg a 20°C)
Furfural Sinónimos: 2- faraldehído, Furfuraldehído, aldehído piromucico, 2-furil- metanal.	$C_5H_4O_2$	161.7	1.1563	Alcohol, éter, benceno, agua	2
Propiolaldehído Sinónimos: 2- propinal, Propargialaldehído	$C_3H_2O_2$	59	ND	ND	ND
Propionaldehído Sinónimos: Propanal, Aldehído propiónico	C_3H_6O	48.8	0.8058	Agua, alcohol, éter.	300

Fuente : Brabec, 1981.

2.8.3. Ésteres

Abad (2012) menciona que Hengstebeck (1964), reporta que entre los esteres formados durante la fermentación alcohólica el más importante es el acetato de etilo, existiendo algunos homólogos superiores producto del alcohol etílico. Las propiedades físicas de los esteres más importantes formados en la fermentación alcohólica son las que se presentan en el cuadro 1.6.

Cuadro 1.6. Propiedades físicas de los esteres más importantes formados en la fermentación alcohólica.

Nombre	Fórmula	Punto de ebullición (°C)	Punto de fusión (°C)	Densidad (g/cm ³) a 20 °C	Nº de átomos de carbono
Acetato de metilo	CH_3COOCH_3	57	-98	0.924	3
Formiato de etilo	$HCOOC_2H_5$	54	-81	0.923	3
Propionato de metilo	$CH_3CH_2COOCH_3$	80	-88	0.917	4
Acetato de etilo	$CH_3COOC_2H_5$	77	-83	0.901	4
Formiato de propilo	$HCOOC_3H_7$	81	-93	0.906	4
Butirato de metilo	$CH_3(CH_2)_2COOCH_3$	103	-84.3	0.898	5
Propionato de etilo	$CH_3CH_2COOC_2H_5$	99	-74	0.894	5
Acetato de propilo	$CH_3COOC_3H_7$	102	-93	0.891	5
Formiato de butilo	$HCOOC_4H_9$	107	-92	0.889	5
Benzoato de etilo	$C_6H_5HCOOC_2H_5$	213	-34	0.1051	9

Fuente: Fassett, 1983.

2.8.4. Alcoholes superiores.

Según Presscott, (1962), los alcoholes superiores son aquellos alcoholes que existen en proporciones muy pequeñas y ejercen influencia en el aroma.

2.9. Disminución de contaminantes atmosféricos por la industria del etanol

El problema de la emisiones de contaminantes se presentas debido a la quema de la caña que se efectúa en varios países cañeros como método de cosecha, para eliminar los hojas o residuos antes de la cosecha, lanza a la atmósfera casi 4.5 t de CO₂/ha, como resultado de la combustión. Esto induce también la contaminación del aire por un alto contenido de CO y hollín, así como el efecto progresivo de la degradación, principalmente microbiológica, de los suelos. El bagazo es considerado un combustible limpio en relación al medio ambiente ya que se obtienen menores emisiones de partículas, CO₂ y otros gases de efecto invernadero (GEI) comparadas con las de los combustibles fósiles.

Tabla 2.6. Cuantificación de la contaminación por emisiones atmosféricas producidas / hectárea quemada de cultivo de la caña de azúcar.

Fuente	Partículas		CO		Hidrocarburos		SO ₂	
	Kg.ha ⁻¹	Kg.año ^{-1*}	kg.ha ⁻¹	Kg.año ^{-1*}	kg.ha ⁻¹	Kg.año ^{-1*}	kg.ha ⁻¹	Kg.año ^{-1*}
Quema	76	12600	822	136620	121	20160		
Requema	44	7380	496	82640	70	11700		
Calderas	280	51600					62	11400
Total	400	71580	1318	219060	191	31860	62	11400

Fuente: Molina (1998)

* en miles

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.Lugar y fecha de ejecución del trabajo

En el Laboratorio de Productos Agrícolas de la Facultad de Agronomía y en el Laboratorio de Química Analítica de la Facultad de Química de la Universidad Nacional de Piura; y en el Laboratorio Control de Calidad de Etanol de la empresa Caña Brava - Grupo Romero, entre los meses febrero y septiembre del año 2014.

3.2.Materia prima e insumos

- Plantas de sorgo dulce (*Sorghum bicolor* Var. Sugar drip) con 90 días de periodo vegetativo, instalado en los terrenos agrícolas del centro de investigación y producción agrícola de la facultad de agronomía de la Universidad Nacional de Piura.
- Bacteria *Zimomonas Mobilis*

3.3.Materiales, equipos y reactivos

3.3.1. Material de vidrio

- | | |
|--|---------------------------------|
| - Buretas de 25, 50 y 100 ml | - Pipetas de 1, 5 y 10 ml. |
| - Fiolas de 50, 100, 250, 500 y 1000 ml. | - Probeta de 50, 100 y 1000 ml. |
| - Matraz Erlenmeyer de 100 y 250 ml | - Simulador de reactor |
| - Tubos de ensayo 10 ml | |

3.3.2. Otros Materiales

- | | |
|-------------------------|---------------------------|
| - Mangueras de plástico | - Embudos |
| - Papel filtro | - Libretas de apuntes, |
| - Tapones de goma | - Cámara fotográfica. |
| - Tela organza | - Plumones |
| - Lapiceros | - Marcadores de plásticos |

3.3.2.1. Equipos

- Balanza analítica. Marca: ProcetScientific, modelo: BE 1030HA.
- Alcohólimetro Gay – Lussac, rango: 0 – 100 °GL. Marca: France.
- Rotavapor. Marca: LabTech
- Termómetro de mercurio, rango: 0 a 150 °C. Marca: France
- Mufla Marca: THERMO SCIENTIFIC, modelo: FB1315M
- Columna de destilación de rellenos. (Elab. Propia).
- Cocina eléctrica. Marca: Nuova.
- Soxhlet. Marca: G10-0012
- pH metro. Marca: CIENYTE
- Refrigeradora. Marca: Samsung
- Cromatógrafo de gases. Marca: Perkin Elmer
- Densímetro digital. Marca: AntonPaar, Modelo: DMA 4500M
- Espectrofotómetro. Marca: Coleman
- Baño maría. Marca: SWB6D.
- Refractómetro, rango: 0 a 32 °Brix. Modelo: RHB - 32 ATC
- Estufa. Marca: San Jormod. Modelo: SE33A

3.3.2.2. Reactivos

- Ácido sulfúrico.
- Bisulfito de sodio 0.05 M.
- Hidróxido de sodio 0.1 N.
- Fenolftaleína.
- Ácido clorhídrico 4 M.
- Etanol absoluto (CAS 64-17-5).
- Metanol (CAS 67-56-1)
- Propan-1-ol (CAS 71-23-8).
- Patrones internos sugeridos:
- 4-metil-2-pentanol
- Etilhexanol
- 2- metilbutan-1-ol (CAS 137-32-6)
- 3-metilbutan-1-ol (CAS 123-51-3)
- Acetato de etilo (CAS 141-78-6)
- Butan-1-ol (CAS 71-36-3)
- Butan 2-ol (CAS 78-92-2)
- Acetaldehído (CAS 75-07-0)
- Acetal(CAS 105-57-7)
- 2-metilpropan-1-ol (cas 78-33-1).
- Pentan-3-ol (CAS71-41-0),
- 4 metilpentan-1-ol (CAS 626-89-1) o nonánoato de metilo (CAS- 1731-84-6)

3.4. Metodología para la producción de biocombustible a partir de biomasa lignocelulósica sorgo dulce.

La biomasa lignocelulósica del Sorgo Dulce (hojas y tallo), según el tiempo y la temperatura de extracción por vapor fue evaluado de la siguiente manera: A= 210 °C x 5 min, B = 210 °C x 10.0 min, C= 220 °C x 5 min y D= 220 °C x 10.0 min; desarrollando las siguientes etapas:

- **Recepción y selección de materia prima.**-Con el objetivo determinar la cantidad y calidad de biomasa lignocelulósica de sorgo dulce, que estén libre de impurezas y cumplen las condiciones necesarias para realizar el pretratamiento y proceso de fermentación. Aquí se realizó una caracterización en la biomasa lignocelulósica.
- **Pretratamiento.**- La primera etapa en un proceso de producción de etanol vía enzimática a partir de material lignocelulósico es el pretratamiento, que tiene como objetivo principal alterar la compleja estructura de la biomasa lignocelulósica aumentando la accesibilidad de las enzimas. En este trabajo se empleó el pretratamiento por explosión por vapor (EV) que combina un efecto químico o autohidrólisis con un efecto mecánico. Éste último está causado por la rápida despresurización del reactor que provoca una evaporación del agua que impregna la biomasa, creando fuerzas de cizalla que dan lugar a la separación de las fibras.
- **Fermentación.**- Es la etapa en donde se inoculan las bacterias que convirtieron los azúcares de la biomasa lignocelulósica de sorgo dulce en alcohol y dióxido de carbono.
- **Destilación.**- Operación que consistió en separar los componentes de una mezcla líquida aprovechando las diferencias en sus presiones de vapor y el punto de ebullición. El proceso que se realizó para obtener bioetanol a partir del sorgo dulce se esquematiza en el diagrama de operaciones del proceso de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica de sorgo dulce mostrado en la **figura 2.1.**, y para determinar el rendimiento físico de biomasa lignocelulósica de sorgo dulce se esquematiza en la **figura 2.2.**

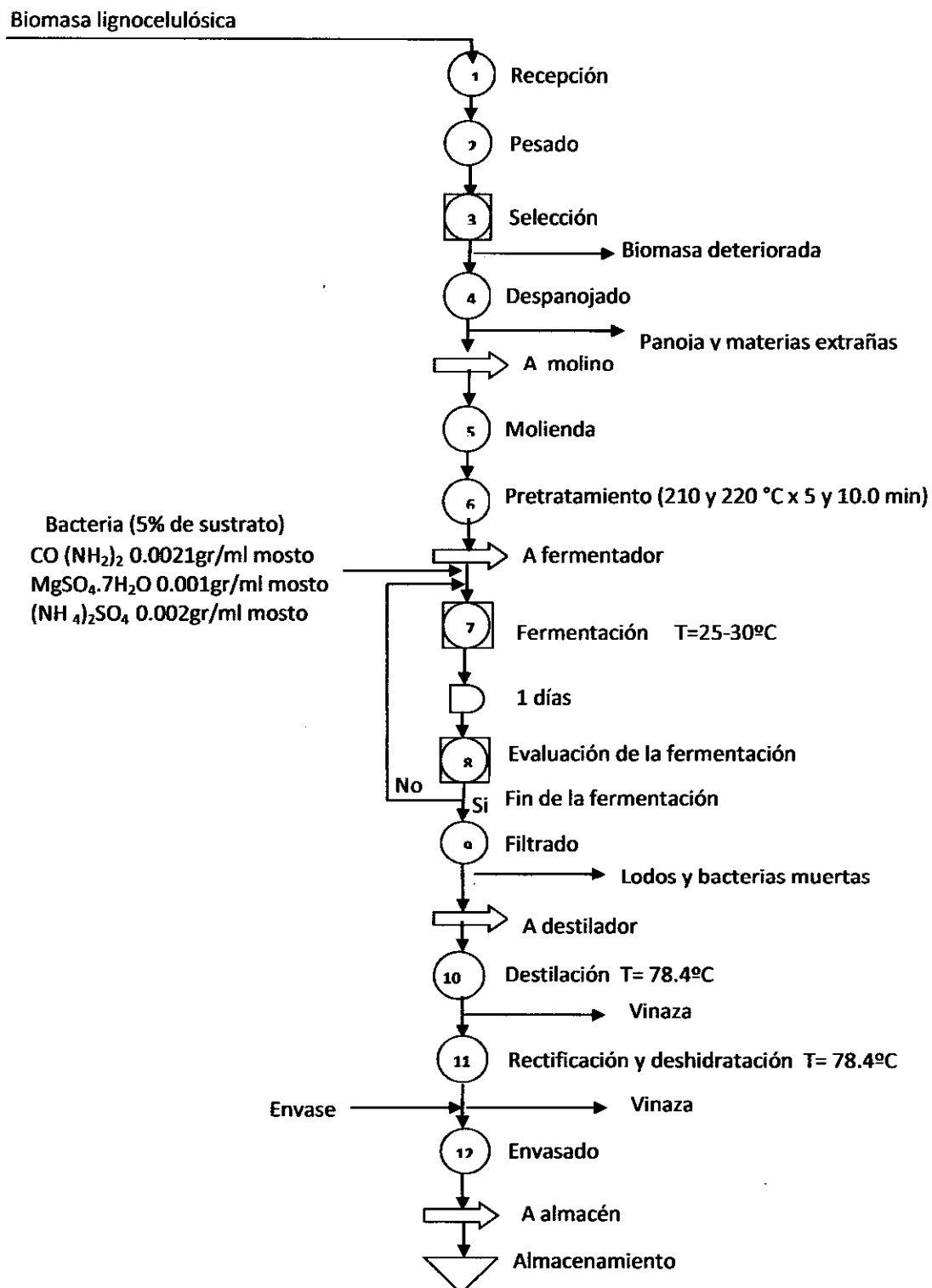


FIGURA 2.1. Operaciones del proceso de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica del sorgo dulce.

Fuente: Elaboración propia

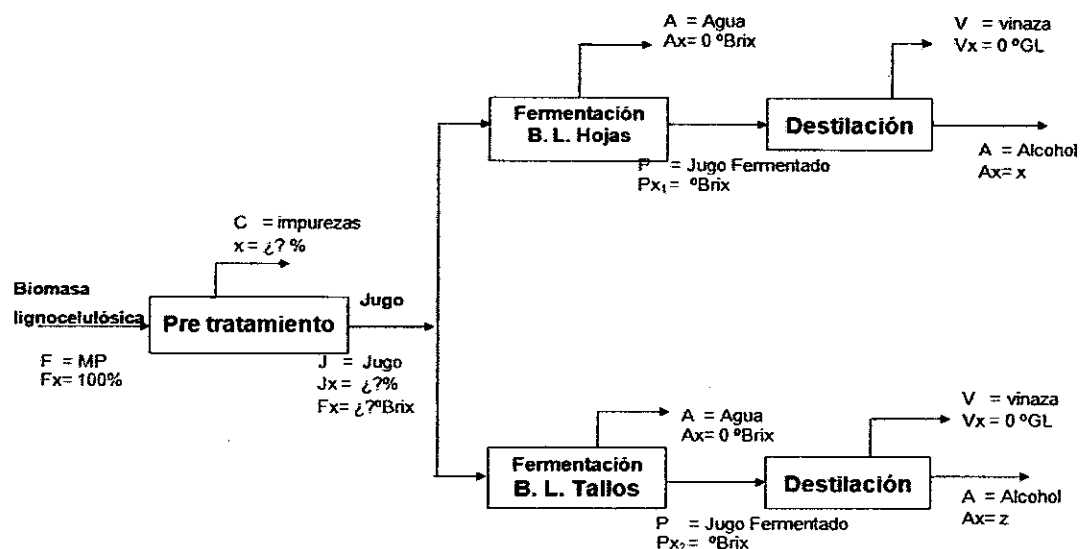


FIGURA 2.2. Rendimiento físico de Biomasa lignocelulósica del sorgo dulce.

Fuente: Elaboración propia

3.4.1. Análisis de la Biomasa Lignocelulósica de sorgo dulce

La selección de la muestra de la materia prima a analizar se realizó de la siguiente manera: de 20 kg de tallos y 20 kg de hoja (periodo vegetativo 90 días), se seleccionaron cantidades representativas de cada muestra.

3.4.2. Métodos de Análisis Físico Químicos

Tabla 3.1. Análisis físico – químico de la biomasa lignocelulósica del cultivo de sorgo dulce

Determinación		Fuente
Humedad	:	A.O.A.C. 920.151 (2005)
Grasa	:	A.O.A.C 960.39 (2005).
Cenizas	:	A.O.A.C. 940.26 (2005)
Materia orgánica	:	Walkley y Black
Nitrógeno total	:	A.O.A.C. 981.10 (2005)
Fósforo disponible	:	A.O.A.C. 965.17 (2005)
Celulosa	:	ANSI/ASTM D1103-60
Hemicelulosa	:	ANSI/ASTM D1103-60
Lignina	:	ANSI/ASTM D1106-56

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 3.2. Análisis de mosto biomasa lignocelulósica de sorgo dulce pre tratada durante la etapa de fermentación.

Determinación	Fuente
Sólidos solubles	: A.O.A.C. 981.12 (2005).
pH	: A.O.A.C. 973.41 (2005).
Acidez	: A.O.A.C. 947.05 (2005).
Fuentes:	O.A.AC : Association of Official Analytical Chemists

Tabla 3.3. Determinaciones de características fisico- químicas del bioetanol obtenido a partir de la biomasa lignocelulósica del cultivo de sorgo dulce.

Determinaciones	Unidad	Fuente
Grado alcohólico	°GL	Densímetro Digital
Densidad	mg/cm ³	Densímetro Digital
pH		A.O.A.C. 973.41 (2005).
Alcoholes superiores	ppm Alcoholes superiores	NTP 211.035. 2008
Aldehídos	ppm Furfural	NTP 211.035. 2008
Acidez acética total	mg Ácido Acético / 100ml AA	NTP 211.035. 2008
Esteres	ppm Acetato de Etilo	NTP 211.035. 2008
Metanol	ppm Metanol	NTP 211.035. 2008

AA= alcohol anhidro (Etanol)

Fuente: NTP 211.035. (2008).

3.4.3. Análisis del producto final.

a) Determinación de Grado Alcohólico.

El densímetro utilizado para determinar la densidad y el grado alcohólico del etanol es marca Anton Paar, modelo DMA 4500M, es un instrumento digital con control-medición integrado para la temperatura que proporciona resultados de la densidad de alta calidad. El densímetro utiliza el método del tubo vibrante, en el cual, se introdujo 10 ml de la sustancia a medir, el tubo empieza a oscilar de tal manera que se va registrando en forma de periodos de vibración, estos periodos son convertidos en resultados de densidad y se registra dentro de la memoria del densímetro.

b) Determinación de acidez total.

Según INDECOPI reportado en la NTP °N 211.040.2003, que consistió en:

- Tomar 100 mL de alcohol como muestra.
- Entibiar ligeramente por un minuto, para eliminar el CO₂.
- Agregar fenolftaleína 2 mL como indicador.
- Titular con hidróxido de sodio 0.1 N y anotar el gasto.

Acidez total como ácido acético, mg /100 mL AA= 60 x N x V_{AT} x F_V x F_G

Dónde:

N = Normalidad de la solución de hidróxido de sodio, N= 0.1

V_{AT}= Volumen de NaOH 0.1 N gastado en titulación, mL.

V_M = Volumen de muestra utilizado, mL.

F_V = Factor de corrección de volumen= 100 / V_M

G_A = Grado alcohólico de la muestra a 15 °C, % Alc. Vol.

F_G = Factor de corrección para alcohol anhidro = 100 / G_A

c) Determinación de Metanol, Aldehídos, Esteres y Alcoholes Superiores por Cromatografía de Gases.

Según INDECOPI reportado en la NTP 211.035. 2008, que consistió en:

• **Solución patrón – A**

Pipetear los componentes que se indican en la tabla 3.4 más adelante en un matraz aforado de 100 ml que contenga aproximadamente 60 ml de solución de etanol al 40% v/v, para reducir al máximo evaporación de los componentes, enrasar con solución de etanol al 40% v/v y mezclar cuidadosamente. Anotar el peso del matraz vacío y después de la adición de cada componente, así como el peso final total.

• **Solución patrón – B**

Pipetear 3 ml de pentan-3-ol u otro patrón interno adecuado en un matraz aforado de 100 ml que contenga aproximadamente 80 ml Propan-1-ol (CAS 71-23-8), enrasar con Propan-1-ol (CAS 71-23-8) y mezclar cuidadosamente. Anotar el peso del matraz vacío y después de la adición de cada componente, así como peso final total.

Tabla 3.4. Componentes utilizados para Solución patrón – A

Componente	Volumen (ml)
Metanol (CAS 67-56-1)	3.0
Propan-1-ol (CAS 71-23-8).	3.0
2-metilpropan-1-ol (cas 78-33-1).	3.0
2- metilbutan-1-ol (CAS 137-32-6)	3.0
3-metilbutan-1-ol (CAS 123-51-3)	3.0
Acetato de etilo (CAS 141-78-6)	3.0
Butan-1-ol (CAS 71-36-3)	3.0
Butan 2-ol (CAS 78-92-2)	3.0
Acetaldehído (CAS 75-07-0)	3.0
Acetal (CAS 105-57-7)	3.0

Fuente: INDECOPI NTP 211.035. 2008

• **Solución patrón de control de calidad (CC)**

- Pipetear 9 ml de solución patrón D y 1 ml de solución patrón E en un matraz y mezclar cuidadosamente
- Anotar el peso del matraz vacío y después de la adición de cada componente, así como el peso final total.

PROCEDIMIENTO

Preparación de la muestra

- Pesar un matraz adecuado, debidamente tapado, y anotar su peso.
- pipetear 9 ml de la muestra de laboratorio en el matraz y anotar el peso (Muestra).
- Añadir 1 ml de la solución patrón E y anotar el peso.
- Agitar la muestra vigorosamente (realizando por lo menos 20 inversiones).
- Las muestras deberán almacenarse a una temperatura inferior a 5 °C antes de su análisis para reducir al máximo las pérdidas de sustancias volátiles.

Ensayo en blanco

- Con la balanza analítica de 0,1 mg de precisión, pesar el matraz y anotar el peso.

- Pipetear 9 ml de solución de etanol al 40 %v/v en el matraz y anotar el peso.
- Añadir 1 ml de la solución patrón E y anotar el peso.
- Agitar la disolución vigorosamente (realizando por lo menos 20 inversiones). Las muestras deberán almacenarse a una temperatura inferior a 5 °C antes de análisis para reducir al máximo las pérdidas de sustancias volátiles.

Ensayo preliminar

Injectar la solución patrón C para comprobar que todos los analitos se separa con una resolución mínima de 0,8 (excepto el 2-metilbutan-1-ol y el 3-metilbutan-1-ol).

Determinación

Injectar la solución patrón C y dos soluciones patrón de CC, Proseguir con las muestras problema (preparadas con arreglo a los apartados Preparación de la muestra y Ensayo en blanco), insertando un patrón de CC cada 10 muestras para garantizar la estabilidad. Injectar una solución patrón C cada 5 muestras.

CALCULO

Puede utilizarse un sistema automatizado de tratamiento de datos, siempre que éstos puedan comprobarse con arreglo a principios establecidos en la **NTP 211.035. 2008**.

3.4.4. Diseño experimental y análisis estadístico.

3.4.4.1. Tratamientos

El Tipo de sustrato, Temperaturas de extracción por vapor y el Periodo de tiempo de extracción por vapor fueron evaluados con los siguientes tratamientos ver Tabla 3.5.

Tabla 3.5. Tratamientos

Nº	Tratamientos	Clave
Tipo sustrato		
1	Hojas	S ₁
2	Tallo	S ₂
Temperaturas de extracción por vapor		
1	210 °C	T ₁
2	220 °C	T ₂
Periodo de tiempo de extracción por vapor		
1	5.0 min	P ₁
2	10.0 min	P ₂

Fuente: Elaboración propia

3.4.4.2. Diseño Estadístico

El diseño experimental fue de tipo Factorial 2³, teniendo como Factor A = Dos tipos de sustrato (hojas y tallo), Factor B = Dos temperaturas de extracción por vapor (210 y 220 °C) y Factor C = Dos periodos tiempo de extracción por vapor (5.0 y 10.0 min.); con cuatro repeticiones; en repeticiones (1, 2, 3 y 4). La unidad experimental 100 ml.

Modelo estadístico del Factorial:

$$Y_{ijkl} = \mu + \tau_i + \beta_j + \gamma_k + (\tau\beta)_{ij} + (\tau\gamma)_{ik} + (\beta\gamma)_{jk} + (\tau\beta\gamma)_{ijk} + \xi_{ijkl}$$

i= 1,2,..., a = Número de tipos de sustrato

j= 1,2,..., b = Número de temperaturas

k= 1, . . ., c = Número de periodo de tiempo

l = 1, . . ., n = Número Repeticiones

Dónde:

Y_{ij} = unidad experimental que recibe el tratamiento i y está en el bloque j .

μ = es la medida global o efecto medio.

t_i = es el efecto del tratamiento i -ésimo.

β_j = es el efecto del tratamiento j -ésimo.

γ_k = es el efecto del tratamiento k -ésimo.

$(\tau\beta)_{ij}$ = es el efecto de la interacción de los tratamientos ij -ésimo.

$(\tau\gamma)_{ik}$ = es el efecto de la interacción de los tratamientos ik -ésimo.

$(\beta\gamma)_{jk}$ = es el efecto de la interacción de los tratamientos jk -ésimo.

$(\tau\beta\gamma)_{ijk}$ = es el efecto de la interacción de los tratamientos ijk -ésimo.

ξ_{ijk} = es el término del error usual

Este diseño aparece en la tabla 3.6. La respuesta observada ($y_{11} \dots y_{34}$), son las evaluaciones físico – químicas de (pH, acidez, sólidos totales, etc.)

Tabla 3.6. Diseño de Factorial.

Factor A = Tipo sustrato	Factor B = Temperaturas de extracción por vapor							
	210 °C				220 °C			
	Factor C = Periodos tiempo de extracción por vapor				Factor C = Periodos tiempo de extracción por vapor			
	5.0 min		10.0 min		5.0 min		10.0 min	
Hojas	Y_{1111}	Y_{1112}	Y_{1121}	Y_{1122}	Y_{2111}	Y_{2112}	Y_{2121}	Y_{2122}
	Y_{1113}	Y_{1114}	Y_{1123}	Y_{1124}	Y_{2113}	Y_{2114}	Y_{2123}	Y_{2124}
Tallo	Y_{1211}	Y_{1212}	Y_{1221}	Y_{1222}	Y_{2211}	Y_{2212}	Y_{2221}	Y_{2222}
	Y_{1213}	Y_{1214}	Y_{1223}	Y_{1224}	Y_{2213}	Y_{2214}	Y_{2223}	Y_{2224}

Fuente: Elaboración propia.

3.4.4.3. Análisis Estadístico

Para el análisis estadístico, se empleó el análisis de varianzas y la prueba de Duncan al nivel de significación de 0,05 para los efectos principales. Para todos estos análisis se aplicará la técnica estadística señalada por Montgomery (2002). El procedimiento de los datos se efectuará con el modelo ANVA. El método utilizado será el presentado en la tabla 3.7.

Tabla 3.7. Análisis de varianza para el experimento

Fuentes de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F_o
Factor A		$a - 1 = 1$		
Factor B		$b - 1 = 1$		
Factor C		$c - 1 = 1$		
Interacción AB		$(a - 1)(b - 1) = 1$		
Interacción AC		$(a - 1)(c - 1) = 1$		
Interacción BC		$(b - 1)(c - 1) = 1$		
Interacción ABC		$(a - 1)(b - 1)(c - 1) = 1$		
Error		$abc(n - 1) = 24$		
Total		$abcn - 1 = 31$		

Fuente: Elaboración propia

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Análisis de físico químico de biomasa lignocelulósica de Sorgo Dulce

Para el Análisis de la biomasa lignocelulósica de Sorgo Dulce (*Sorghum bicolor* Var. *Sugar Drip*), la selección de las muestras de materia prima se realizó de la siguiente manera: De un cuarto de hectárea de Sorgo Dulce dividida en 4 bloques y cada bloque consta de 5 parcelas de 2.4mx6m (14.4m²) con 91 días de periodo vegetativo, cosechándose los surcos centrales o área central de 1.2 mx6m (7.2 m²).

En el cuadro 4.1., se muestran los resultados del análisis físico-químico de la biomasa lignocelulósica de Sorgo dulce, obtenidos de los tratamientos en estudio que se realizaron en el Laboratorio de Productos Agrícolas de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Piura.

En el contenido de humedad en Sorgo Dulce se muestra un porcentaje de 72.31% en tallo y en las hojas 44.42%. En el tallo tiene relación directa con el alto nivel higroscópico de la médula, así como el nivel de porosidad de las partículas; de ahí, su capacidad de absorción entre 70 y 80% de humedad (Villar, *et al.*, 1996).

En el análisis de grasa total se muestra un porcentaje de 0.37% para tallos y 3.33% para hojas. Estos valores obtenidos se encuentran de forma referencial entre los datos de grasa total asignado por Morrison (1990), para la Sorgo Dulce; en general de 1.00% pero agrega que la variación se debe a las características propias y metabolismo del cultivar.

En el análisis de cenizas de hojas, al obtener un porcentaje de 10.33%, supera en un 0.17% al valor referencial establecido en por Pereira Hernández, *et al.*, 2010.

Para el análisis de tallo, se muestra un porcentaje de cenizas de 8.59%, el cual se encuentra entre los datos citados por bibliografía. Estos valores están influenciados por la operación de molienda y filtrado del jugo.

En el análisis de fósforo se muestra para (tallo 0.15%) y (hojas 0.92%). El fósforo absorbido es transformado parcialmente en las raíces de planta, tiene una importante función en el desarrollo de la fermentación. (QUINTERO, 1997).

Por tratarse de un material lignocelulósico la composición obtenida para tallo fue principalmente de celulosa 41.78%, hemicelulosa 26.28% y lignina 31.2%, y para hojas un porcentaje de celulosa 36.35%, hemicelulosa 21.44% y lignina 27.99%. El porcentaje de material lignocelulósico obtenido en dichos resultados permite seleccionar la materia prima como resultado más conveniente para el proceso (López, *et al.*, 2001).

La composición de las hojas y tallos empleados en la experimentación, junto con otros encontrados en la bibliografía, se detallan en el cuadro 4.1. Como se observa, el contenido en celulosa (41.30 y 36.80 %) y hemicelulosa (25.50 y 21.00%) varía entre los diferentes lotes. La composición en carbohidratos estructurales y lignina puede variar debido al fertilizante empleado durante su cultivo y el contenido en minerales del suelo o a la madurez que haya alcanzado en grano en el momento de su recolección (Öhgren y *et al.*, 2006). El alto contenido en carbohidratos estructurales hace de este residuo un sustrato potencialmente interesante para la producción de etanol.

Cuadro 4.1. Análisis físico – químico de biomasa lignocelulósica promedio del cultivo de Sorgo Dulce.

ANÁLISIS	TALLO	HOJA
Humedad	72.31	44.42
Grasa	0.37	3.33
Cenizas	8.59	10.33
Materia orgánica	91.41	89.67
Nitrógeno total	1.45	1.71
Fósforo disponible	0.15	0.92
Celulosa	41.78	36.35
Hemicelulosa	26.28	21.44
Lignina	31.02	27.99

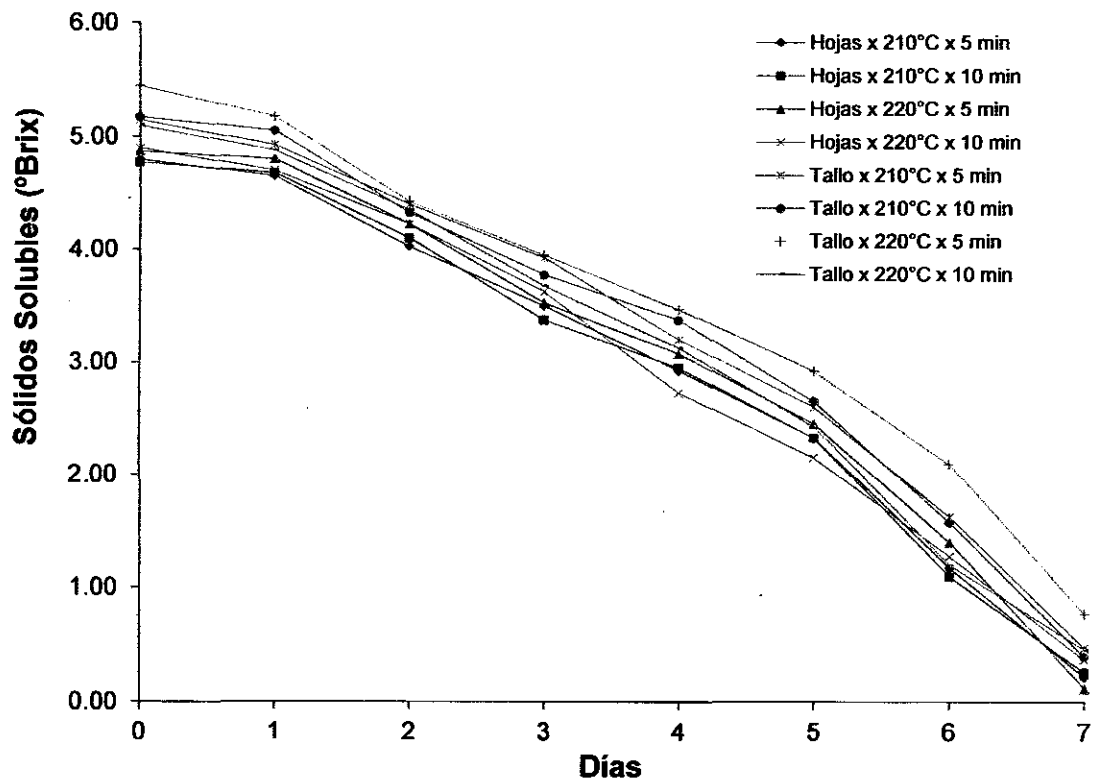
Fuente: Elaboración propia

4.2. Análisis de fermentación

4.2.1. Variación de sólidos solubles totales.

Durante el proceso de fermentación se puede observar en el **anexo 2.1**, que en condiciones de temperatura ambiente, se produce una disminución de los azúcares contenidos en los tratamientos en estudio, muestran que la bacteria *Zymomonas mobilis* sufre restricciones cuando llega a una concentración de 0.22, 0.26, 0.13 y 0.38 °Brix para los tratamiento S₁T₁P₁, S₁T₁P₂, S₁T₂P₁ y S₁T₂P₂; y de 0.48, 0.40, 0.78 y 0.46 °Brix para los tratamiento S₂T₁P₁, S₂T₁P₂, S₂T₂P₁ y S₂T₂P₂; a partir de estos valores se mantiene el contenidos de sólidos solubles constante.

En el **grafico 4.1**, se observa que los azúcares presentes en el medio fueron consumidos en su totalidad. Sin embargo, todavía quedaban tras 168h de fermentación. Cabe mencionar, que los productos tóxicos presentes en el medio de fermentación (furfural, HMF, ácido acético, ácido fórmico, ácido cumárico...) afectan al metabolismo de las bacterias de manera significativa reduciendo la tasa de consumo de los azúcares (Taherzadeh y col., 2000b).

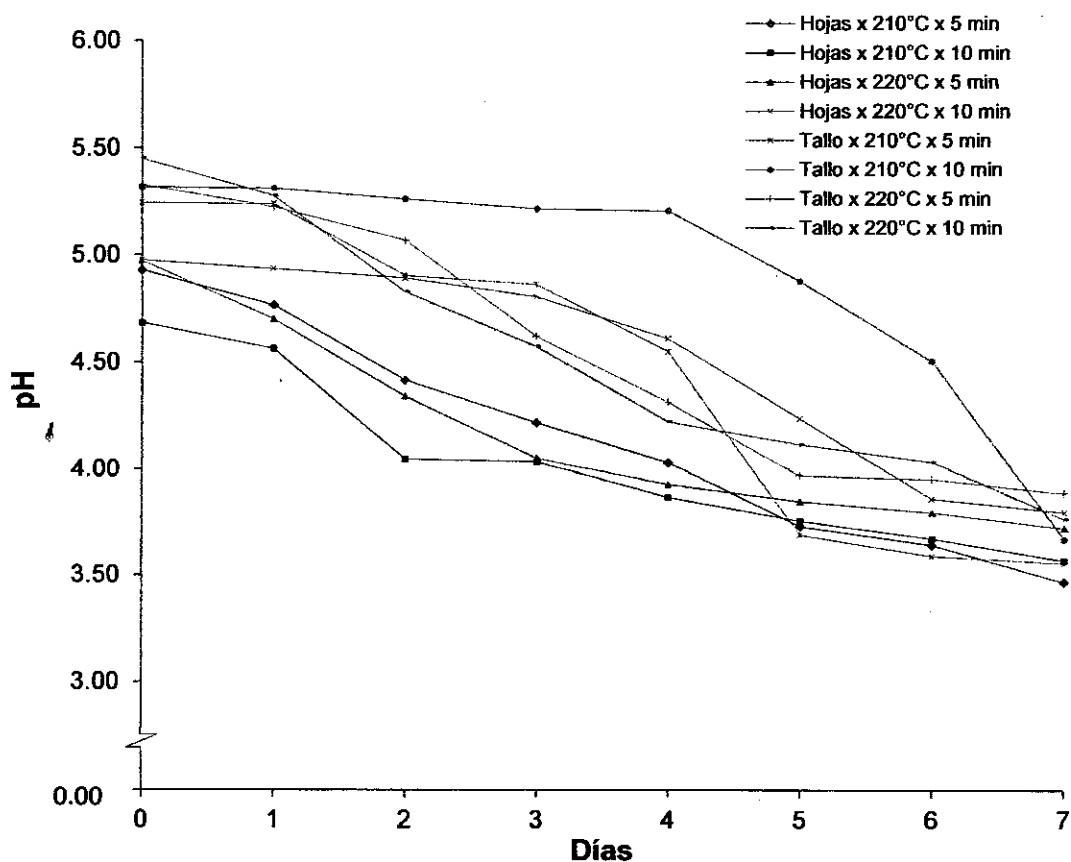


Gráfica 4.1. Variación del contenido de sólidos solubles (°Brix) en el proceso de fermentación para los tratamientos estudiados.

4.2.2. Variación de pH

El proceso de fermentación de Biomasa Lignocelulósica de Sorgo Dulce (*Sorghum bicolor* Var. *Sugar Drip*), se realizó en condiciones ambientales, el valor promedio de pH durante este proceso disminuye ligeramente por el aumento de los iones hidronio producido por la bacteria *Zymomonas mobilis* al transformar los azúcares.

Durante la fermentación se muestra que cuando las bacterias según la ruta de Entner-Doudoroff se generan ácidos y se liberan iones hidronio teniendo un efecto notable sobre la toxicidad, cuando dejan de transformar los azúcares (séptimo día), el valor promedio de pH ha disminuido ligeramente volviéndose constante o no sufre variaciones significativas a valores de 3.47, 3.57, 3.72 y 3.80 de pH para los tratamientos S₁T₁P₁, S₁T₁P₂, S₁T₂P₁ y S₁T₂P₂; y de 3.56, 3.67, 3.89 y 3.77 de pH para los tratamientos S₂T₁P₁, S₂T₁P₂, S₂T₂P₁ y S₂T₂P₂. Tal y como se muestra en el **anexo 2.2** y **Gráfico 4.2**.



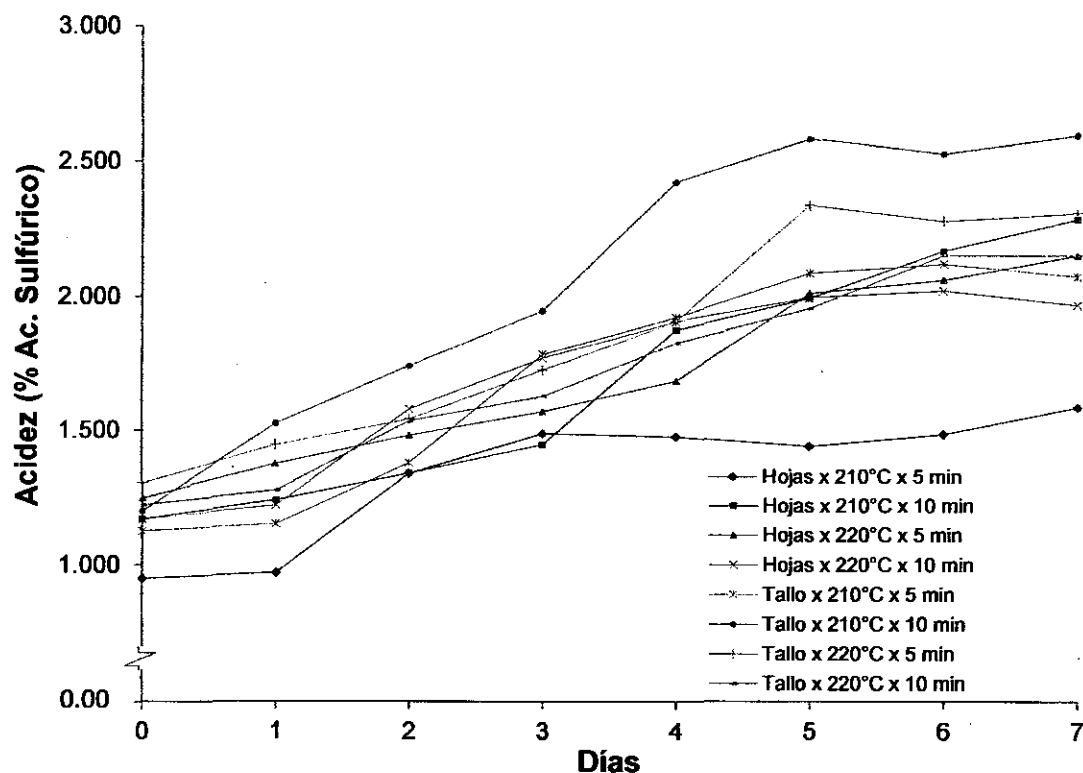
Gráfica 4.2. Variación del pH en el proceso de fermentación para los tratamientos estudiados.

4.2.3. Variación de acidez (% Ac. Sulfúrico)

En el proceso de fermentación en condiciones ambientales de Biomasa Lignocelulósica de Sorgo Dulce (*Sorghum bicolor* Var. *Sugar Drip*), se observó que el valor de la acidez con respecto a la concentración de ácido sulfúrico, durante este proceso aumenta ligeramente por el aumento de la producción de ácidos producidos por la bacteria al transformar los azúcares.

Durante la fermentación se muestra que cuando las bacterias dejan de transformar los azúcares en el sétimo día de iniciada la fermentación, el valor promedio de la acidez se vuelve constante o no sufre variación significa, tanto que aumenta en un cierto periodo del proceso para luego descender hasta 1.490, 2.180, 2.005 y 1.927 % Ac. Sulfúrico para los tratamientos S₁T₁P₁, S₁T₁P₂, S₁T₂P₁ y S₁T₂P₂; y de 1.934, 2.286, 2.092 y 1.933 % Ac. Sulfúrico para los tratamientos S₂T₁P₁, S₂T₁P₂, S₂T₂P₁ y S₂T₂P₂. Tal y como se muestra en el **anexo 2.3** y **Gráfico 4.3**.

Esto respaldado por Tomas et. al (2009), la concentración de ácidos aumenta cuanto mayor fue la temperatura de pretratamiento.



Gráfica 4.3. Variación del contenido de Acidez (% Ac. Sulfúrico) en el proceso de fermentación para los tratamientos en estudio.

4.3. Rendimiento Físico (ml Etanol.kg de sustrato⁻¹)

Según el **Anexo 2.4.**, se reportan los datos experimentales obtenidos como rendimiento físico (ml Etanol.kg de sustrato⁻¹), correspondiente a muestras obtenidas de etanol a partir de los tratamientos en estudio.

En el análisis de varianza del rendimiento físico (ml Etanol.kg de sustrato⁻¹), **cuadro 4.2.**, se aprecia alta significación estadística para el tipo sustrato, temperaturas de extracción por vapor, periodo de tiempo de extracción por vapor e interacción de los mismos. El coeficiente de variabilidad fue 4.36 %.

Efecto Principal Tipo Sustrato.

En el **cuadro 4.3** y **gráfico 4.4**, de la Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad, se visualiza que el sustrato tallo al haber obtenido 384.49 ml Etanol.kg de sustrato⁻¹, superó estadísticamente al sustrato hoja que obtuvo 298.27 ml Etanol.kg de sustrato⁻¹.

Efecto principal Temperaturas de Extracción por Vapor

La Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad, **cuadro 4.3** y **gráfico 4.5**, visualiza que a temperatura de 210°C se obtuvo 446.33 ml Etanol.kg de sustrato⁻¹, superó estadísticamente a la temperatura 220 °C que obtuvo 236.42 ml Etanol.kg de sustrato⁻¹.

Efecto principal Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor

Efectuada la Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad, **cuadro 4.3** y **gráfico 4.6**, se observa que el tiempo extracción por vapor 5.00 min obtuvo 412.02 ml Etanol.kg de sustrato⁻¹, y superó estadísticamente al tiempo extracción por vapor 10.00 min que obtuvo 270.73 ml Etanol.kg de sustrato⁻¹.

Efecto de la interacción Tipo de sustrato sobre la Temperatura de extracción y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor

Del análisis de la Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad, **cuadro 4.3**, se expresa que al estudiar el efecto del Tipo de sustrato Hoja sobre Temperatura de extracción y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor, el tratamiento S₁T₁P₁, S₁T₁P₂ y S₁T₂P₁ al lograr 397.88, 370.65 y 283.06 ml Etanol.kg de sustrato⁻¹ fueron estadísticamente iguales y superaron al tratamiento S₁T₂P₂ que obtuvo 141.48 ml Etanol.kg de sustrato⁻¹.

Para el efecto del Tipo de sustrato Tallo sobre Temperatura de extracción y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor se expresa que el tratamiento S₂T₁P₁ al lograr 615.13 ml Etanol.kg de sustrato⁻¹, supero estadísticamente a los tratamientos S₂T₁P₂ y S₂T₂P₁ que

obtuvieron 401.65 y 352.01 ml Etanol.kg de sustrato⁻¹; y superaron al tratamiento S₂T₂P₂ que obtuvo 169.15 ml Etanol.kg de sustrato⁻¹.

Efecto de la interacción Temperatura de extracción y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor sobre el Tipo de sustrato

Analizada la Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad, **cuadro 4.3**, para la Temperatura de extracción y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor sobre el Tipo de sustrato se determinó en la comparación vertical que tratamiento S₂T₁P₁ al obtener 615.13 ml Etanol.kg de sustrato⁻¹ supero estadísticamente al tratamiento S₁T₁P₁ que obtuvo 397.88 ml Etanol.kg de sustrato⁻¹; sin embargo la parejas de tratamientos S₂T₁P₂ y S₁T₁P₂, S₂T₂P₁ y S₁T₂P₁, y S₂T₂P₂ y S₁T₂P₂ al obtener 401.65 y 370.65, 352.01 y 283.06, y 169.15 y 141.48 ml Etanol.kg de sustrato⁻¹, fueron estadísticamente iguales,

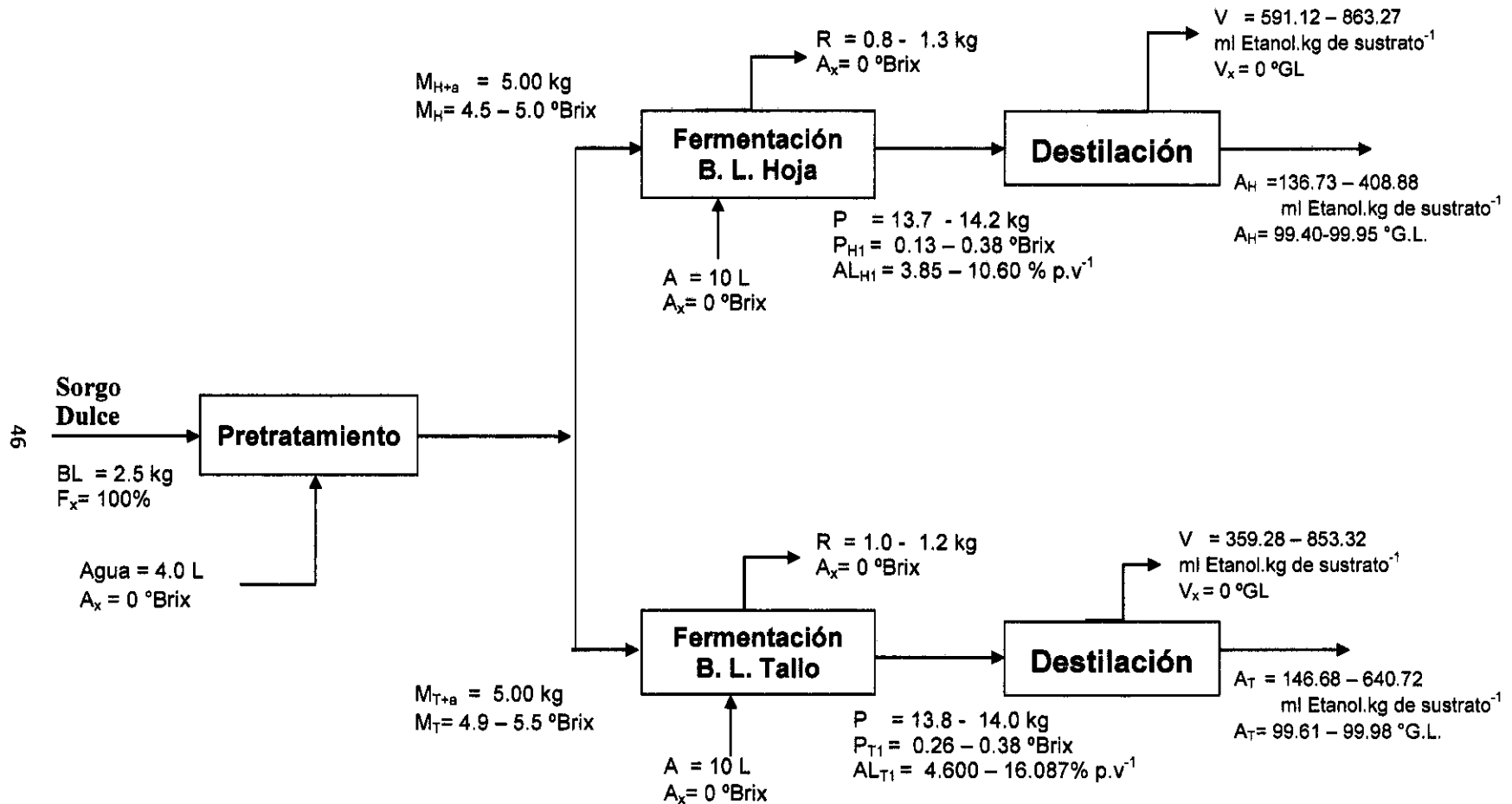
Efecto de la interacción Tipo de sustrato x Temperatura de extracción x Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor

Efectuada la Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad, **cuadro 4.3**, observamos que la interacción entre Tipo de sustrato x Temperatura de extracción x Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor, en promedio el tratamiento S₂T₁P₁ al lograr 615.13 ml Etanol.kg de sustrato⁻¹ supero a todos los tratamiento estudiados

Según **Ward (1989)**, el nivel de producción de alcohol se debe a las restricciones del tipo de Tipo de sustrato x Temperatura de extracción x Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor, a la carencia de los azúcares por degradar y a la inactivación enzimática por parte del alcohol generado; y al tipo de destilación a la que es sometida hasta estar en etapa de equilibrio o azeotropía (**Geankoplis, 1998**).

Para producir altas concentraciones de etanol son necesarias altas cargas de sustrato iniciales impliquen mayor concentración de azúcares fermentables. Teniendo en cuenta el contenido medio en glucosa en la biomasa lignocelulósica, serán necesarias cargas de sustrato de entre 10-15% para asegurar concentraciones de etanol cercanas al 4% (p/p), considerada esta concentración como punto de referencia para una destilación económicamente viable (**Ballesteros y col., 2004; Wingren y col., 2003**). Por lo tanto el mejor rendimiento Físico lo obtuvo el tratamiento S₂T₁P₁ y se visualiza en el **gráfico 4.7**.

Diagrama 01. Rendimiento físico del proceso de producción de etanol a de Biomasa Lignocelulósica de Sorgo Dulce (*Sorghum bicolor* Var. *Sugar Drip*).



Cuadro 4.2. Análisis de varianza para el rendimiento físico (ml Etanol. kg de sustrato⁻¹).

F.V.	S.C.	G.L.	C.M.	F.C.	Sig.
Tipo de sustrato	59471.5432	1	59471.5432	229.0322	**
Temperaturas de extracción por vapor (°C)	352473.8285	1	352473.8285	1357.4199	**
Tiempo de extracción por vapor (min)	159694.3948	1	159694.3948	615.0027	**
Interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C))	11495.5147	1	11495.5147	44.2706	**
Interacción (Tipo de sustrato x Tiempo de extracción por vapor (min))	25885.3011	1	25885.3011	99.6875	**
Interacción (Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min))	3506.3707	1	3506.3707	13.5035	**
Interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min))	10506.0931	1	10506.0931	40.4603	**
Error	6231.9490	24	259.6645		
Total	629264.9950	31			

CV = 4.72%

Cuadro 4.3. Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad para los efectos principales Tipo de sustrato, Temperaturas de extracción por vapor (°C), Tiempo de extracción por vapor (min) e interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min)), sobre el rendimiento físico (ml Etanol. kg de sustrato⁻¹).

Factor B = Temperaturas de extracción por vapor										
Factor A = Tipo sustrato	210 °C				220 °C				Efecto Tipo Sustrato	
	Factor C = Tiempo de extracción por vapor				Factor C = Tiempo de extracción por vapor					
	5.0 min		10.0 min		5.0 min		10.0 min			
Hojas	397.88	A b	370.65	Aa	283.06	Aa	141.48	Ba	298.27	b
Tallo	615.13	Aa	401.65	Ba	352.01	Ba	169.15	Ca	384.49	a
Efecto Temperaturas de Extracción por Vapor					210 °C =	446.33	A	220 °C =	236.42	B
Efecto Periodos Tiempo de Extracción por Vapor					5.0 min =	412.02	A	10.0 min =	270.73	B
Comparaciones horizontales : Letras mayúsculas										
Comparaciones verticales : Letras minúsculas										

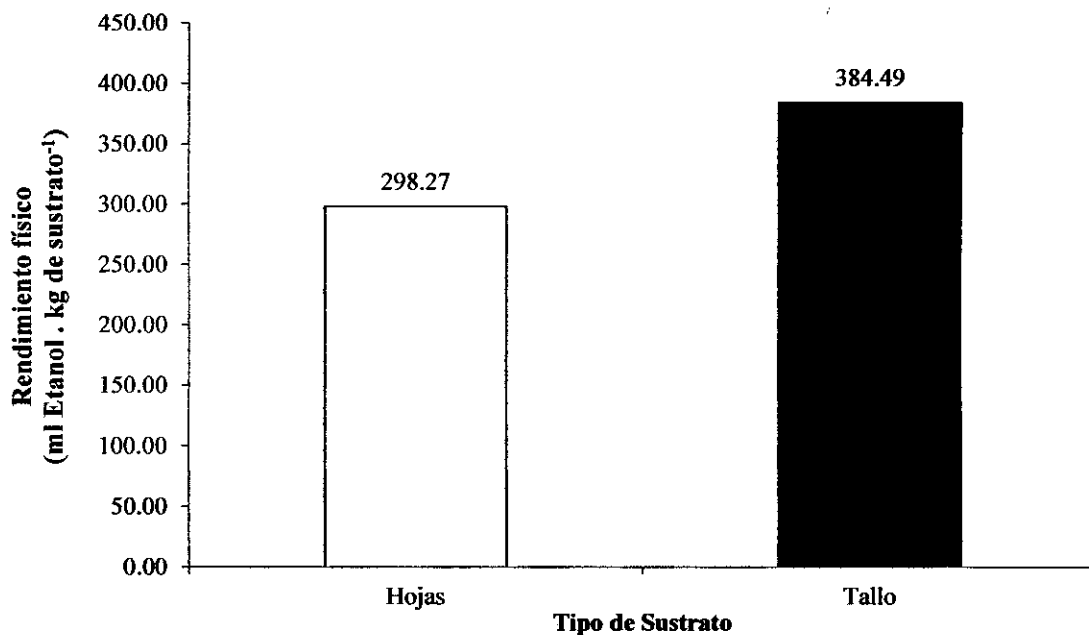


Gráfico 4.4. Efecto principal tipo de sustrato sobre el rendimiento físico (ml Etanol . kg de sustrato⁻¹), del etanol obtenido como producto.

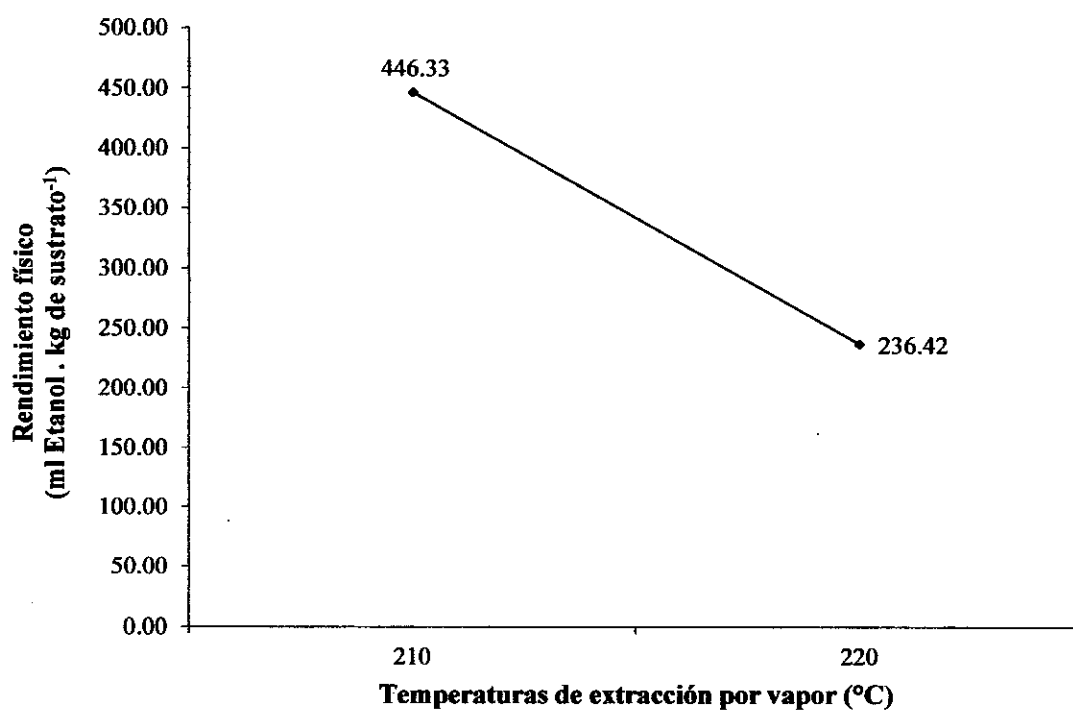


Gráfico 4.5. Efecto principal Temperaturas de extracción por vapor (°C), sobre el rendimiento físico (ml Etanol . kg de sustrato⁻¹), del etanol obtenido como producto.

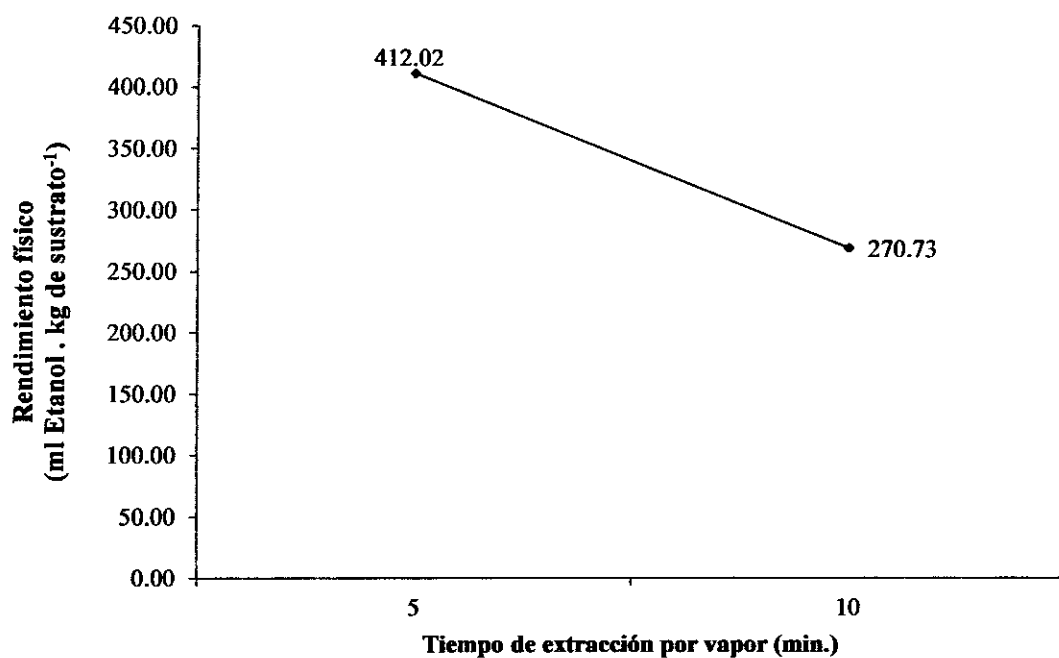


Gráfico 4.6. Efecto principal Tiempo de extracción por vapor (min.), sobre el rendimiento físico (ml Etanol. kg de sustrato⁻¹), del etanol obtenido como producto.

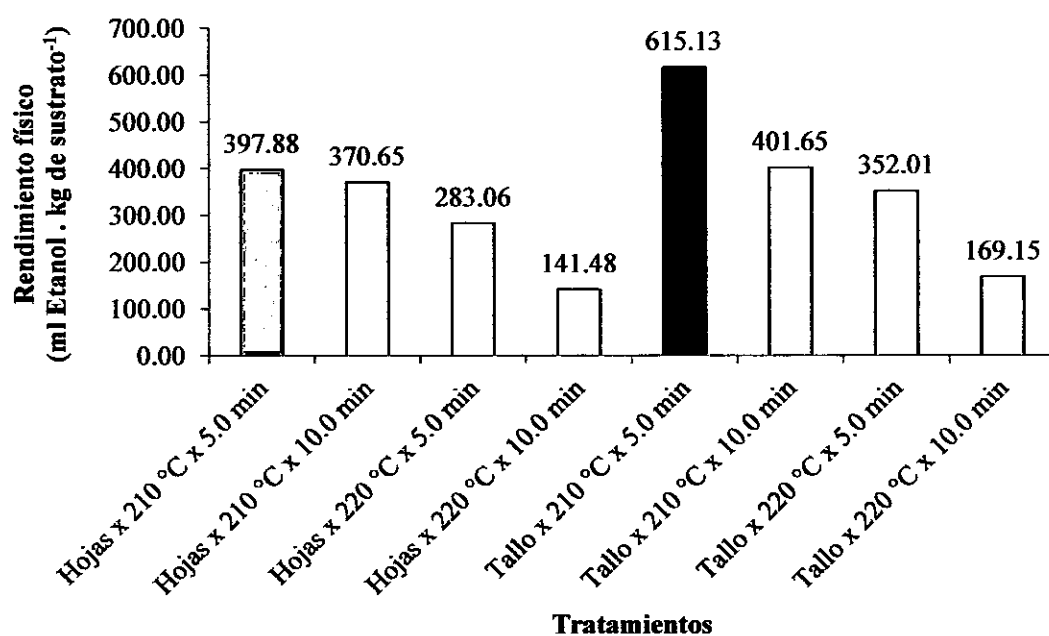


Gráfico 4.7. Efecto de la interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min)), sobre el rendimiento físico (ml Etanol. kg de sustrato⁻¹), del etanol obtenido como producto.

4.4. Producción de etanol (%p.v⁻¹)

Las variables más importantes en el pretratamiento por extracción con vapor, son la temperatura, el tiempo de residencia, el contenido en humedad del material y el tamaño de partícula. Al aumentar la severidad del pretratamiento (mayor temperatura y tiempo) aumenta la solubilización de las hemicelulosas haciéndose la celulosa más accesible al ataque enzimático. Sin embargo, condiciones de pretratamiento demasiado severas se produce una degradación de los azúcares hemicelulósicos y de la celulosa, originándose una serie de productos tóxicos que van a afectar a las etapas posteriores de hidrólisis enzimática y fermentación (Ballesteros y col., 2002b Duff y Murray, 1996).

El **anexo 2.5**, reporta los datos experimentales obtenidos para producción de etanol (%p.v⁻¹), a partir de los tratamientos en estudio. En el **cuadro 4.4.**, análisis de varianza para la producción de etanol (%p.v⁻¹), se observa alta significación estadística para el tipo sustrato, temperaturas de extracción por vapor, periodo de tiempo de extracción por vapor e interacción de los mismos. El coeficiente de variabilidad fue 5.87 %.

Efecto Principal Tipo Sustrato.

En el **cuadro 4.5**, de la Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad, se visualiza que el sustrato tallo al haber obtenido 10.26 %p.v⁻¹, superó estadísticamente al sustrato hoja que obtuvo 7.97 %p.v⁻¹, tal y como se muestra en el **gráfico 4.8**.

Efecto principal Temperaturas de Extracción por Vapor

Realizada la Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad, **cuadro 4.5** y visualizado en el **gráfico 4.9** se indica que a temperatura de 210°C se obtuvo 11.86 %p.v⁻¹, y superó estadísticamente a la temperatura 220 °C que obtuvo 6.37 %p.v⁻¹.

Efecto principal Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor

La Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad, **cuadro 4.5**, expresa que con el tiempo extracción por vapor 5.00 min se obtuvo 10.93 %p.v⁻¹, y superó estadísticamente al tiempo extracción por vapor 10.00 min que obtuvo 7.30 %p.v⁻¹ tal y como se muestra en el **gráfico 4.10**.

Efecto de la interacción Tipo de sustrato sobre la Temperatura de extracción y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor

El análisis de la Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad, **cuadro 4.5**, visualiza que el efecto del Tipo de sustrato Hoja sobre Temperatura de extracción y Periodo de Tiempo

de Extracción por Vapor, los tratamientos $S_1T_1P_1$, $S_1T_1P_2$ y $S_1T_2P_1$ al lograr 10.60, 9.82 y 7.59 %p.v⁻¹ fueron estadísticamente iguales y superaron estadísticamente al tratamiento $S_1T_2P_2$ que obtuvo 3.85 %p.v⁻¹, respectivamente.

Para el efecto del Tipo de sustrato Tallo sobre Temperatura de extracción y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor se expresa que el tratamiento $S_2T_1P_1$ al lograr 16.09 %p.v⁻¹, supero estadísticamente a los tratamientos $S_2T_1P_2$ y $S_2T_2P_1$ que obtuvieron 10.91 y 9.42 %p.v⁻¹ que fueron iguales, y superaron al tratamiento $S_2T_2P_2$ que obtuvo 4.60 %p.v⁻¹ respectivamente.

Efecto de la interacción Temperatura de extracción y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor sobre el Tipo de sustrato

Realizada la Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad, **cuadro 4.5**, se determinó que en comparación vertical para el efecto de la Temperatura de extracción y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor sobre el Tipo de sustrato, el tratamiento $S_2T_1P_1$ al obtener 16.09 %p.v⁻¹ supero estadísticamente al tratamiento $S_1T_1P_1$ que obtuvo 10.60 %p.v⁻¹; sin embargo lo la parejas de tratamientos $S_2T_1P_2$ y $S_1T_1P_2$, $S_2T_2P_1$ y $S_1T_2P_1$, y $S_2T_2P_2$ y $S_1T_2P_2$ al obtener 10.91 y 9.82, 6.42 y 7.59, 4.60 y 3.85 %p.v⁻¹, respectivamente, fueron estadísticamente iguales,

Efecto de la interacción Tipo de sustrato x Temperatura de extracción x Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor

De la Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad, **cuadro 4.5**, se observa que la interacción entre Tipo de sustrato x Temperatura de extracción x Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor, en promedio el tratamiento $S_2T_1P_1$ al lograr 16.09 %p.v⁻¹ supero a todos los tratamiento estudiados.

Para **Ward (1989)**, el nivel de producción de alcohol se debe a las restricciones del tipo de Tipo de sustrato x Temperatura de extracción x Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor, a la carencia de los azúcares por degradar y a la inactivación enzimática por parte del alcohol generado; y al tipo de destilación a la que es sometida hasta estar en etapa de equilibrio o azeotropía (**Geankoplis, 1998**).

Por lo tanto la mejor producción de alcohol la obtuvo el tratamiento $S_2T_1P_1$, tal como se muestra en el **gráfico 4.11**.

Cuadro 4.4. Análisis de varianza para la producción de etanol (%p.v⁻¹).

F.V.	S.C.	G.L.	C.M.	F.C.	Sig.
Tipo de sustrato	41.9569	1	41.9569	332.7492	**
Temperaturas de extracción por vapor (°C)	241.0977	1	241.0977	1912.0819	**
Tiempo de extracción por vapor (min)	105.3854	1	105.3854	835.7838	**
Interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C))	7.9778	1	7.9778	63.2699	**
Interacción (Tipo de sustrato x Tiempo de extracción por vapor (min))	14.9903	1	14.9903	118.8839	**
Interacción (Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min))	3.4192	1	3.4192	27.1171	**
Interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min))	5.5061	1	5.5061	43.6671	**
Error	3.0262	24	0.1261		
Total	423.360	31			
			CV =	3.90 %	

Cuadro 4.5. Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad para los efectos principales Tipo de sustrato, Temperaturas de extracción por vapor (°C), Tiempo de extracción por vapor (min) e interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min)), sobre la producción de etanol (%p.v⁻¹).

Factor B = Temperaturas de extracción por vapor												
Factor A =		210 °C				220 °C				Efecto Tipo Sustrato		
Tipo sustrato	Factor C = Tiempo de extracción por vapor				Factor C = Tiempo de extracción por vapor							
	5.0 min		10.0 min		5.0 min		10.0 min					
Hojas	10.60	A b	9.82	Aa	7.59	Aa	3.85	Ba	7.97	b		
Tallo	16.09	Aa	10.91	Ba	9.42	Ba	4.60	Ca	10.26	a		
Efecto Temperaturas de Extracción por Vapor				210 °C =		11.86		A		220 °C =	6.37	B
Efecto Periodos Tiempo de Extracción por Vapor				5.0 min =		10.93		A		10.0 min =	7.30	B
Comparaciones horizontales										: Letras mayúsculas		
Comparaciones verticales										: Letras minúsculas		

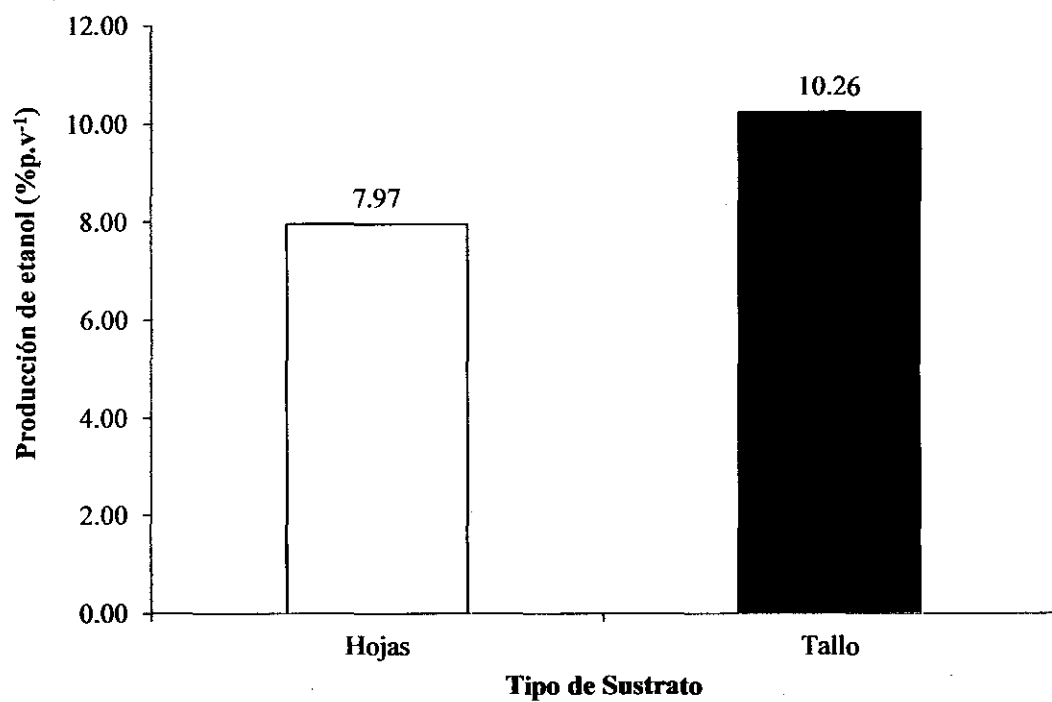


Gráfico 4.8. Efecto principal tipo de sustrato, sobre la producción de etanol (%p.v⁻¹) del etanol obtenido como producto.

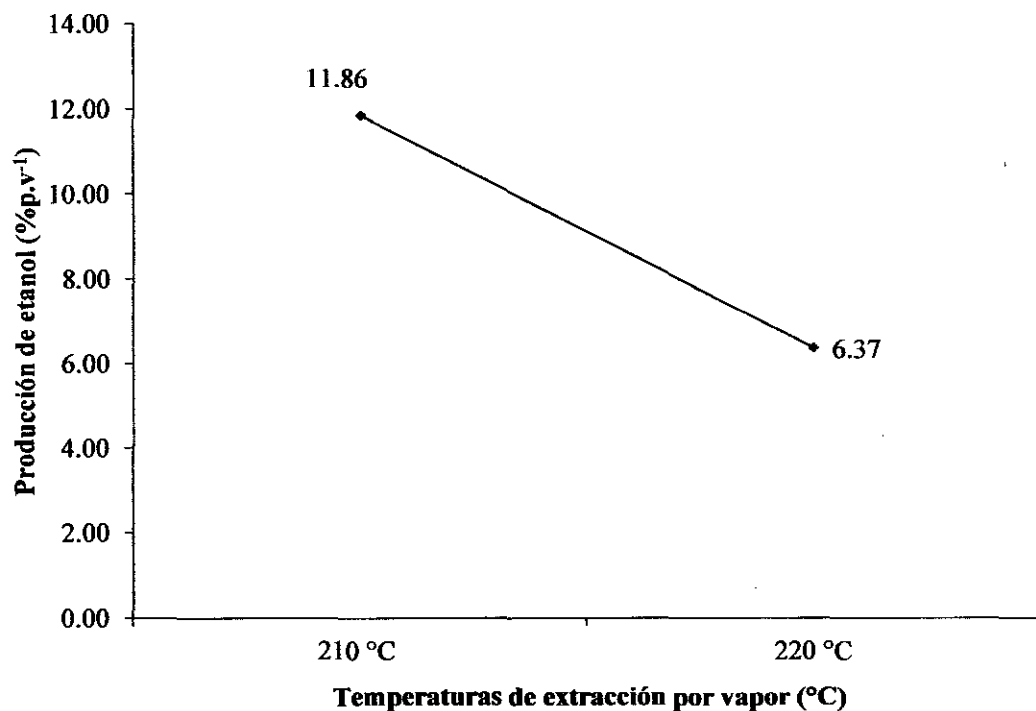


Gráfico 4.9. Efecto principal Temperaturas de extracción por vapor (°C), sobre la producción de etanol (%p.v-1), del etanol obtenido como producto.

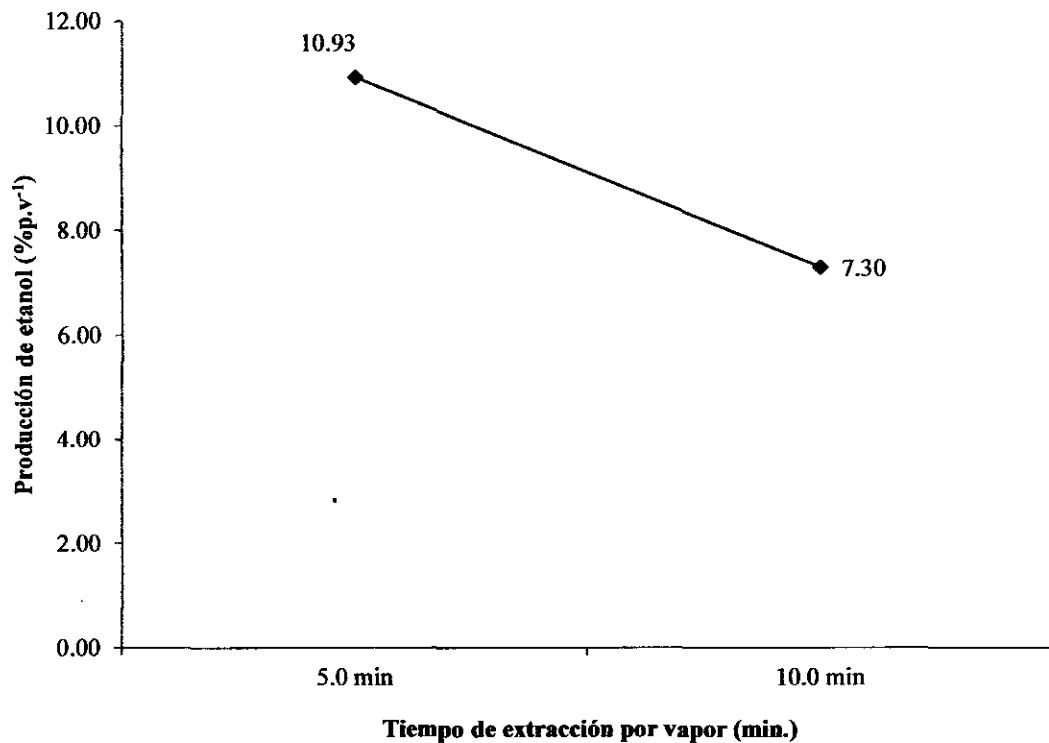


Gráfico 4.10. Efecto principal Tiempo de extracción por vapor (min.), sobre la producción de etanol (%p.v-1), del etanol obtenido como producto.

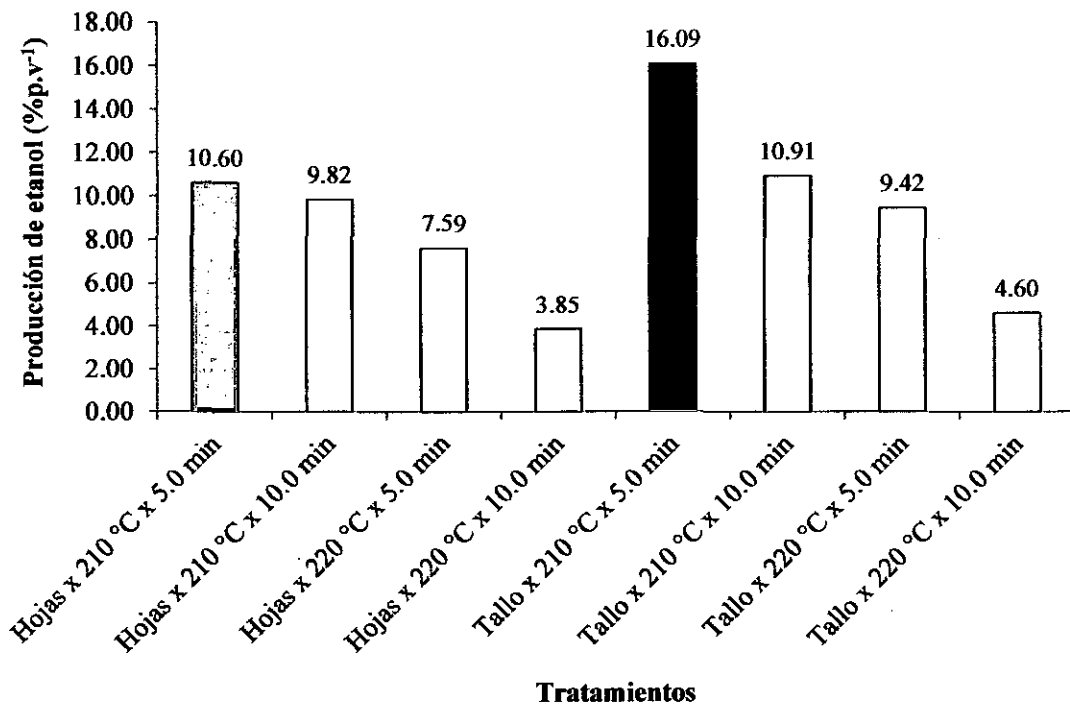


Gráfico 4.11. Efecto de la interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min)), sobre la producción de etanol (%p.v-1), del etanol obtenido como producto.

4.5. Tasa de producción alcohólica (gh.l⁻¹)

En el **cuadro 4.6.** y el **Anexo 2.6** se reportan los resultados de la tasa de producción alcohólica (gh.l⁻¹), teniendo en cuenta los tratamientos en estudio Tipo de sustrato, Temperaturas de extracción por vapor (°C) y Tiempo de extracción por vapor (min).

En el proceso de fermentación se observó que la mayor producción alcohólica (gh.l⁻¹) se obtiene con el tratamiento S₂T₁P₁ que obtuvo una tasa de 0.293 en el tercer día de fermentación y supero a los tratamientos S₂T₁P₂ y S₂T₂P₁ que obtuvieron una tasa de 0.215, y 0.178 en el tercer día de fermentación, y superaron al tratamientos S₂T₂P₂ que obtuvo una tasa de 0.095 en el segundo día de fermentación. Sin embargo para el sustrato hoja la mayor tasa de producción alcohólica (gh.l⁻¹) la obtuvieron en el sexto y séptimo día de fermentación y no superaron a las tasas obtenidas por con el sustrato tallo. En el **grafico 4.12** se observa que los azúcares presente en el medio fueron consumidos en su totalidad durante las primeras 48-72 h de proceso para el sustrato tallo. Sin embargo, todavía quedaban azúcares residuales tras 148 h de fermentación. Cabe mencionar, que los productos tóxicos presentes en el medio de fermentación (furfural, HMF, ácido acético, ácido fórmico, ácido cumárico) afectan al metabolismo de las bacterias de manera significativa reduciendo la tasa de consumo de los azúcares (Taherzadeh y col., 2000b).

Cuadro 4.6. Tasa promedio de producción alcohólica (gh.l⁻¹).

Día	Hojas x 210°C x 5 min	Hojas x 210°C x 10 min	Hojas x 220°C x 5 min	Hojas x 220°C x 10 min	Tallo x 210°C x 5 min	Tallo x 210°C x 10 min	Tallo x 220°C x 5 min	Tallo x 220°C x 10 min
0-1	0.005	0.006	0.005	0.005	0.010	0.011	0.012	0.003
1a2	0.025	0.018	0.028	0.023	0.125	0.070	0.075	0.095
2a3	0.024	0.028	0.030	0.024	0.293	0.215	0.178	0.060
3a4	0.019	0.024	0.027	0.028	0.148	0.103	0.072	0.020
4a5	0.025	0.025	0.025	0.026	0.060	0.036	0.037	0.009
5a6	0.040	0.040	0.053	0.047	0.025	0.015	0.016	0.005
6a7	0.057	0.048	0.025	0.035	0.010	0.005	0.003	0.000

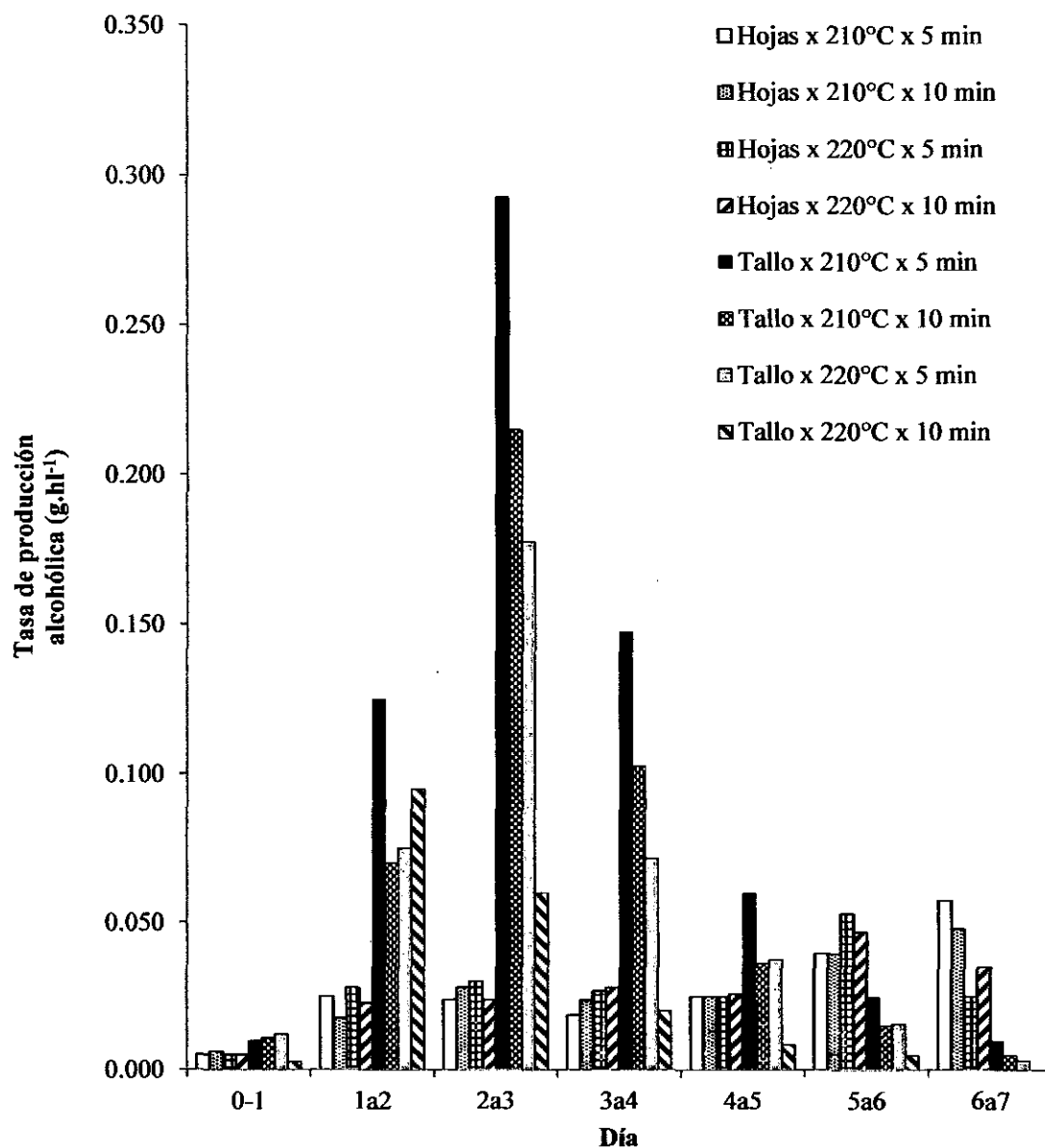


Gráfico 4.12. Tasa promedio de producción alcohólica (gh.l⁻¹).

4.6. Análisis cromatográfico del etanol

4.6.1. Grado alcohólico (°G.L.)

El **Anexo 3.1**, se reportan los datos experimentales obtenidos para el grado alcohólico (°G.L.), correspondientes a muestras obtenidas de etanol a partir de los tratamientos en estudio.

El análisis de varianza para el grado alcohólico (°G.L.), **cuadro 4.7**, reporta que no existe estadística para el tipo sustrato, temperaturas de extracción por vapor, periodo de tiempo de extracción por vapor e interacción de los mismos. El coeficiente de variabilidad fue 0.13 %.

Efecto Principal Tipo Sustrato.

La Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad, **cuadro 4.8**, visualiza que el sustrato hoja y tallo al haber obtenido 99.84 y 99.85 °G.L., fueron estadísticamente iguales.

Efecto principal Temperaturas de Extracción por Vapor

Analizada la Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad en el **cuadro 4.8**, se indica que a temperatura de 220 y 210 °C fueron estadísticamente iguales y obtuvieron 99.84 y 99.86 °G.L.

Efecto principal Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor

Realizada la Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad, **cuadro 4.8**, se observa que con el tiempo extracción por vapor 5 y 10 min fueron estadísticamente iguales y obtuvieron 99.86 y 99.84 °G.L.

Efecto de la interacción Tipo de sustrato sobre la Temperatura de extracción y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor

En el **cuadro 4.8**, de la Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad reporta que el efecto del Tipo de sustrato Hoja sobre Temperatura de extracción y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor se expresa que los tratamientos $S_1T_1P_1$, $S_1T_1P_2$, $S_1T_2P_1$ y $S_1T_2P_2$ al obtener 99.84, 99.81, 99.89 y 99.84 °G.L., respectivamente, fueron estadísticamente iguales.

Para el efecto del Tipo de sustrato Tallo sobre Temperatura de extracción y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor se expresa que el tratamiento $S_2T_1P_1$, $S_2T_1P_2$, $S_2T_2P_1$ y $S_2T_2P_2$ al obtener 99.80, 99.92, 99.89 y 99.80 °G.L., respectivamente, fueron estadísticamente iguales.

Efecto de la interacción Temperatura de extracción y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor sobre el Tipo de sustrato

La Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad, cuadro 4.8, expresa que el efecto de la Temperatura de extracción y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor sobre el Tipo de sustrato se indica en la comparación vertical que los tratamientos $S_1T_1P_1$ y $S_2T_1P_1$, $S_1T_1P_2$ y $S_2T_1P_2$, $S_1T_2P_1$ y $S_2T_2P_1$; y $S_1T_2P_2$ y $S_2T_2P_2$ al obtener 99.84 y 99.80, 99.81 y 99.92, 99.89 y 99.89; y 99.84 y 99.80 °G.L, fueron superaron estadísticamente

Efecto de la interacción Tipo de sustrato x Temperatura de extracción x Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor

En el cuadro 4.8, de la Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad visualiza que la interacción entre Tipo de sustrato x Temperatura de extracción x Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor, y expresa que en promedio los tratamientos e interacciones fueron estadísticamente iguales.

Para Ward (1989), el grado alcohólico del etanol obtenido dependerá del tipo de destilación a la que es sometida hasta estar en etapa de equilibrio o azeotropía (Geankoplis, 1998).

Cuadro 4.7. Análisis de varianza para el grado alcohólico (°G.L.)

F. V.	S.C.	G.L.	C.M.	Fo.	Sign.
Tipo de sustrato	0.0008	1	0.0008	0.0491	NO
Temperaturas de extracción por vapor (°C)	0.0015	1	0.0015	0.0928	NO
Tiempo de extracción por vapor (min)	0.0018	1	0.0018	0.1105	NO
Interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C))	0.0060	1	0.0060	0.3714	NO
Interacción (Tipo de sustrato x Tiempo de extracción por vapor (min))	0.0055	1	0.0055	0.3384	NO
Interacción (Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min))	0.0242	1	0.0242	1.4854	NO
Interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min))	0.0190	1	0.0190	1.1670	NO
Error	0.3910	24	0.0163		
Total	0.4499	31			
			CV =	0.13%	

Cuadro 4.8. Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad para los efectos principales Tipo de sustrato, Temperaturas de extracción por vapor (°C), Tiempo de extracción por vapor (min) e interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min)), sobre el grado alcohólico (°G.L.).

Factor B = Temperaturas de extracción por vapor									
Factor A = Tipo sustrato	210 °C				220 °C				Efecto Tipo Sustrato
	Factor C = Tiempo de extracción por vapor				Factor C = Tiempo de extracción por vapor				
	5.0 min		10.0 min		5.0 min		10.0 min		
Hojas	99.84	Aa	99.81	Aa	99.89	Aa	99.84	Aa	99.84 a
Tallo	99.80	Aa	99.92	Aa	99.89	Aa	99.80	Aa	99.85 a
Efecto Temperaturas de Extracción por Vapor			210 °C =		99.84 A		220 °C =		99.86 A
Efecto Periodos Tiempo de Extracción por Vapor			5.0 min =		99.86 A		10.0 min =		99.84 A
Comparaciones horizontales : Letras mayúsculas									
Comparaciones verticales : Letras minúsculas									

4.6.2. Determinación de Densidad (g.cm^{-3})

Según el Anexo 3.2, se reportan los datos experimentales obtenidos para la densidad (g.cm^{-3}), correspondientes a muestras obtenidas de etanol a partir de los tratamientos en estudio.

Del análisis de varianza para la densidad (g.cm^{-3}), **cuadro 4.9**, se aprecia que existe alta significación estadística para el tipo sustrato, temperaturas de extracción por vapor, periodo de tiempo de extracción por vapor e interacción de los mismos. El coeficiente de variabilidad fue 0.87 %.

Efecto Principal Tipo Sustrato.

En la Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad, **cuadro 4.10 y gráfico 4.13**, se visualiza que el sustrato tallo al haber obtenido 0.8794 g.cm^{-3} superó estadísticamente al sustrato hoja que obtuvo 0.8449 g.cm^{-3} .

Efecto principal Temperaturas de Extracción por Vapor

De efectuar la Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad, **cuadro 4.10 y gráfico 4.14**, se indica que a temperatura de 210°C se obtuvo 0.8814 g.cm^{-3} , y superó estadísticamente a la temperatura 220°C que obtuvo 0.8429 g.cm^{-3} .

Efecto principal Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor

Realizada el análisis de la Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad, **cuadro 4.10 y gráfico 4.15**, se indica que el tiempo de extracción por vapor 5.00 se obtuvo 0.8715 g.cm^{-3} , y superó estadísticamente al tiempo 10.00min que obtuvo 0.8525 g.cm^{-3} .

Efecto de la interacción Tipo de sustrato sobre la Temperatura de extracción y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor

Efectuado el análisis de la Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad, **cuadro 4.10**, se expresa que el efecto del Tipo de sustrato Hoja sobre Temperatura de extracción y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor se expresa que los tratamientos $S_1T_1P_1$, $S_1T_1P_2$ y $S_1T_2P_1$ al lograr 0.8733, 0.8658 y 0.8430 g.cm^{-3} , fueron estadísticamente iguales y superaron al tratamiento $S_1T_2P_2$ que obtuvo 0.7978 g.cm^{-3} , respectivamente.

El sustrato Tallo sobre Temperatura de extracción y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor expresa que los tratamientos $S_2T_1P_1$, $S_2T_1P_2$ y $S_2T_2P_1$ al obtener con 0.8973, 0.8894 y 0.8725 g.cm⁻³, y superaron estadísticamente al tratamiento $S_2T_2P_2$ que obtuvo 0.8583 g.cm⁻³.

Efecto de la interacción Temperatura de extracción y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor sobre el Tipo de sustrato

La Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad, **cuadro 4.10**, indica que el efecto de la Temperatura de extracción y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor sobre el Tipo de sustrato se indica en la comparación vertical que los tratamientos $S_1T_1P_1$ y $S_2T_1P_1$, $S_1T_1P_2$ y $S_2T_1P_2$, $S_1T_2P_1$ y $S_2T_2P_1$ al obtener 0.8733 y 0.8973, 0.8658 y 0.8894, y 0.8430 y 0.8725 g.cm⁻³ fueron estadísticamente iguales. Sin embargo para la comparación entre $S_2T_2P_2$ y $S_1T_2P_2$ el primero supero al segundo ya que obtuvieron 0.8583 y 0.7978 g.cm⁻³.

Efecto de la interacción Tipo de sustrato x Temperatura de extracción x Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor

De la Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad, **cuadro 4.10**, se determina que la interacción entre Tipo de sustrato x Temperatura de extracción x Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor en promedio los tratamientos $S_1T_1P_1$ y $S_2T_2P_1$ al lograr 0.8733 y 0.8973 g.cm⁻³ superaron estadísticamente a los demás tratamientos evaluados tal como se muestra en el **gráfico 4.16**.

Para Krestzschmar (1961), reportado por Adanaque (2009), las impurezas comúnmente presentes en los productos destilados influyen en la densidad son: ácidos, aldehídos, ésteres y alcoholes superiores.

Cuadro 4.9. Análisis de varianza para la densidad (g.cm⁻³).

F. V.	S.C.	G.L.	C.M.	Fo.	Sign.
Tipo de sustrato	0.0095	1	0.0095	167.9732	**
Temperaturas de extracción por vapor (°C)	0.0119	1	0.0119	210.6564	**
Tiempo de extracción por vapor (min)	0.0028	1	0.0028	49.6674	**
Interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C))	0.0009	1	0.0009	15.8999	**
Interacción (Tipo de sustrato x Tiempo de extracción por vapor (min))	0.0005	1	0.0005	8.3282	**
Interacción (Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min))	0.0010	1	0.0010	17.2802	**
Interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min))	0.0005	1	0.0005	8.7129	**
Error	0.0014	24	0.0001		
Total	0.0283	31			

CV = 0.87%

Cuadro 4.10. Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad para los efectos principales

Tipo de sustrato, Temperaturas de extracción por vapor (°C), Tiempo de extracción por vapor (min) e interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min)), sobre la concentración de densidad (g.cm⁻³).

Factor B = Temperaturas de extracción por vapor										
Factor A = Tipo sustrato	210 °C				220 °C				Efecto Tipo Sustrato	
	Factor C = Tiempo de extracción por vapor				Factor C = Tiempo de extracción por vapor					
	5.0 min		10.0 min		5.0 min		10.0 min			
Hojas	0.8733	Aa	0.8658	Aa	0.8430	Aa	0.7978	B b	0.8449	b
Tallo	0.8973	Aa	0.8894	Aa	0.8725	Aa	0.8583	Ba	0.8794	a
Efecto Temperaturas de Extracción por Vapor			210 °C = 0.8814		A		220 °C = 0.8429		B	
Efecto Tiempo de Extracción por Vapor			5.0 min = 0.8715		A		10.0 min = 0.8528		B	
Comparaciones horizontales			: Letras mayúsculas							
Comparaciones verticales			: Letras minúsculas							

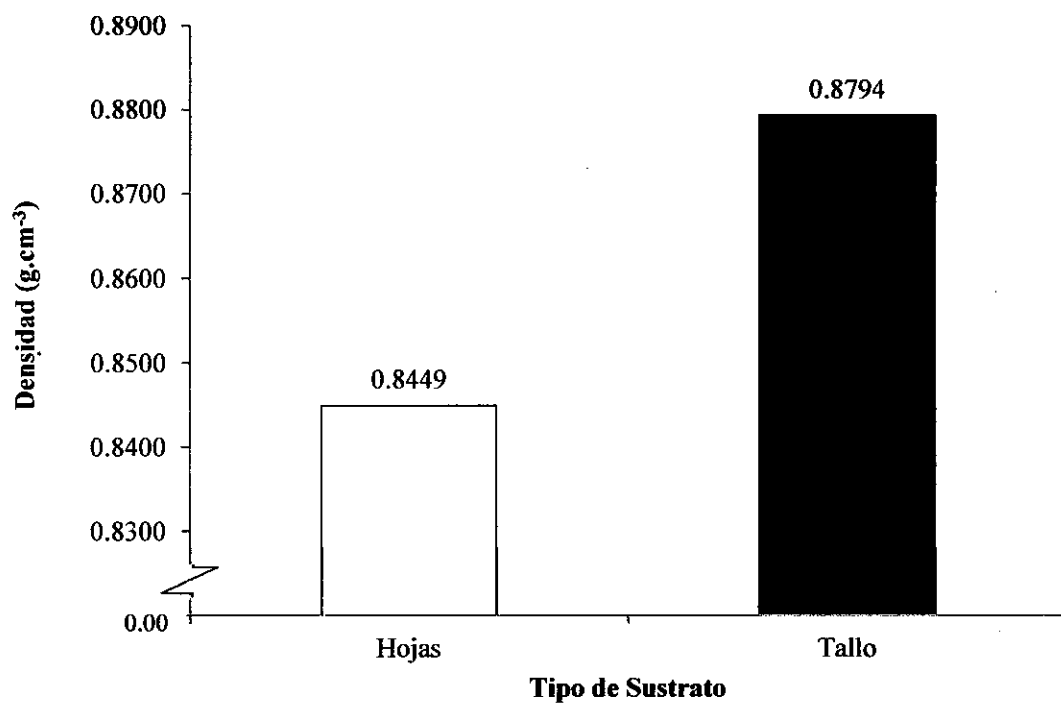


Gráfico 4.13. Efecto principal tipo de sustrato, sobre la densidad (g.cm⁻³) del etanol obtenido como producto.

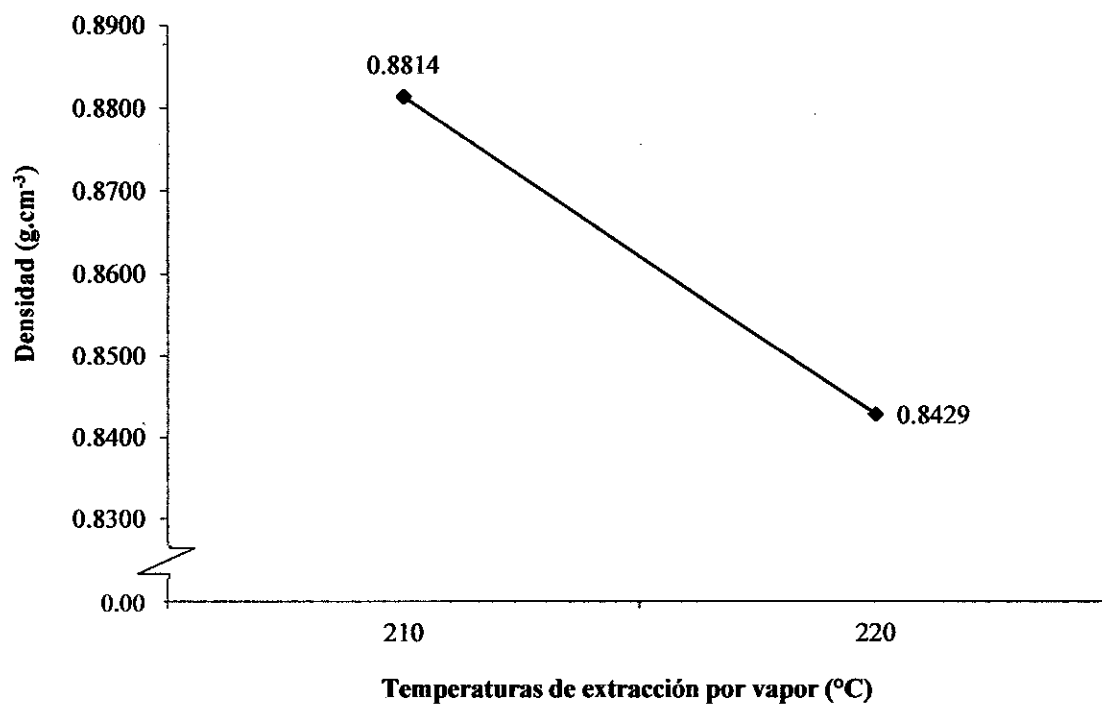


Gráfico 4.14. Efecto principal Temperaturas de extracción por vapor (°C), sobre la densidad (g.cm⁻³) del etanol obtenido como producto.

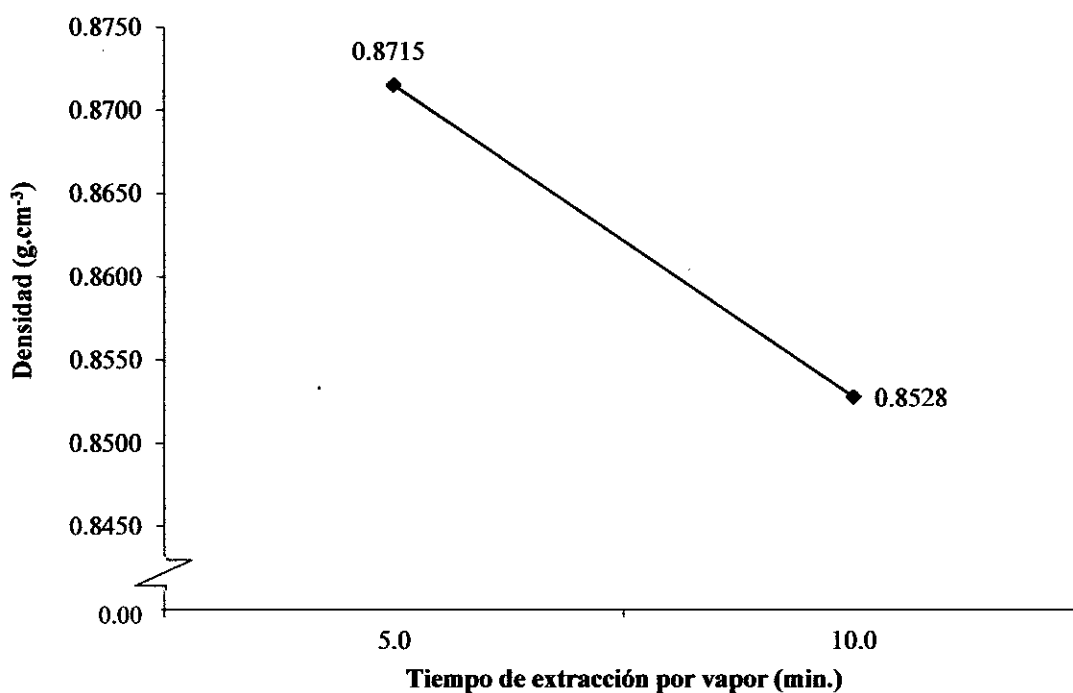


Gráfico 4.15. Efecto principal tiempo de extracción por vapor (min.) sobre densidad (g.cm⁻³) del etanol obtenido como producto.

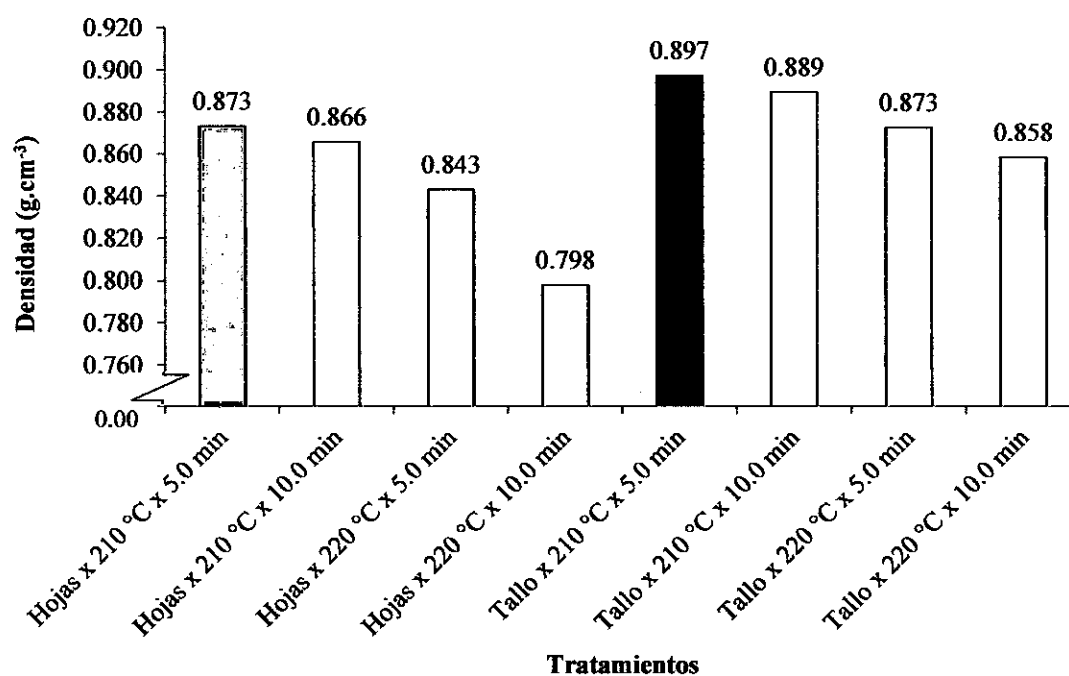


Gráfico 4.16. Efecto de la interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min)), sobre la densidad (g.cm⁻³), del etanol obtenido como producto.

4.6.3. Determinación de pH

En el **Anexo 3.3**, se reportan los datos experimentales de la densidad (mg.cm^{-3}), correspondientes a muestras obtenidas de etanol a partir de los tratamientos en estudio.

En el análisis de varianza para el pH, **cuadro 4.11**, se aprecia que no existe significación estadística para el tipo sustrato, temperaturas de extracción por vapor, periodo de tiempo de extracción por vapor e interacción de los mismos. El coeficiente de variabilidad fue 17.70 %.

Efecto Principal Tipo Sustrato.

Efectuada la Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad, **cuadro 4.12**, se visualiza que el sustrato hoja y tallo al haber obtenido un pH de 7.1327 y 7.1133, fueron estadísticamente iguales.

Efecto principal Temperaturas de Extracción por Vapor

La Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad, **cuadro 4.12**, indica que a temperaturas de 210 y 220°C se obtuvo un pH de 7.1082 y 7.1375, fueron estadísticamente iguales.

Efecto principal Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor

En el **cuadro 4.12**, de la Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad, se indica que los tiempos de extracción por vapor de 5.00 y 10.00 min obteniendo valores de 7.1244 y 7.1222 pH, fueron estadísticamente iguales.

Efecto de la interacción Tipo de sustrato sobre la Temperatura de extracción y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor

Analizada la Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad, **cuadro 4.12**, se determinó que el efecto del Tipo de sustrato Hoja sobre Temperatura de extracción y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor se expresa que los tratamientos $S_1T_1P_1$, $S_1T_1P_2$, $S_1T_2P_1$ y $S_1T_2P_2$ que obtuvieron 7.1425, 7.1283, 7.1475 y 7.1125 de pH, fueron estadísticamente iguales.

Del mismo modo el efecto del Tipo de sustrato Tallo sobre Temperatura de extracción y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor expresa que los tratamientos $S_2T_1P_1$, $S_2T_1P_2$, $S_2T_2P_1$ y $S_2T_2P_2$ que obtuvieron 7.0425, 7.1233, 7.1650 y 7.1250 de pH, fueron estadísticamente iguales.

Efecto de la interacción Temperatura de extracción y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor sobre el Tipo de sustrato

Al analizar la Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad, **cuadro 4.12**, expresa que la Temperatura de extracción y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor sobre el Tipo de sustrato, la comparación vertical de los tratamientos $S_1T_1P_1$ y $S_2T_1P_1$, $S_1T_1P_2$ y $S_2T_1P_2$, $S_1T_2P_1$ y $S_2T_2P_1$; y $S_1T_2P_2$ y $S_2T_2P_2$ obtuvieron pHs de 7.1425 y 7.0425, 7.1283 y 7.1233, 7.1475 y 7.1650; y 7.1125 y 7.1250; fueron estadísticamente iguales.

Efecto de la interacción Tipo de sustrato x Temperatura de extracción x Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor

En el **cuadro 4.12**, de la Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad, expresa que la interacción entre Tipo de sustrato x Temperatura de extracción x Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor, en promedio los tratamientos $S_1T_1P_1$, $S_1T_1P_2$, $S_1T_2P_1$ y $S_1T_2P_2$, $S_2T_1P_1$, $S_2T_1P_2$, $S_2T_2P_1$ y $S_2T_2P_2$ son estadísticamente iguales.

Para Palmqvist et al (1999), el descenso del pH en el etanol se debe a presencia del ácido acético generado durante la fermentación y que en su mayoría son separados durante la destilación.

Cuadro 4.11. Análisis de varianza para el pH.

F. V.	S.C.	G.L.	C.M.	Fo.	Sign.
Tipo de sustrato	1.7219	1	1.7219	1.0829	NO
Temperaturas de extracción por vapor (°C)	1.7941	1	1.7941	1.1283	NO
Tiempo de extracción por vapor (min)	1.6007	1	1.6007	1.0067	NO
Interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C))	1.8350	1	1.8350	1.1541	NO
Interacción (Tipo de sustrato x Tiempo de extracción por vapor (min))	1.4293	1	1.4293	0.8989	NO
Interacción (Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min))	1.3436	1	1.3436	0.8450	NO
Interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min))	1.4125	1	1.4125	0.8883	NO
Error	38.1621	24	1.5901		
Total	49.2992	31			

CV = 17.70%

Cuadro 4.12. Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad para los efectos principales Tipo de sustrato, Temperaturas de extracción por vapor (°C), Tiempo de extracción por vapor (min) e interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min)), sobre el pH.

Factor B = Temperaturas de extracción por vapor									
Factor A = Tipo sustrato	210 °C				220 °C				Efecto Tipo Sustrato
	Factor C = Tiempo de extracción por vapor				Factor C = Tiempo de extracción por vapor				
	5.0 min		10.0 min		5.0 min		10.0 min		
Hojas	7.1425	Aa	7.1283	Aa	7.1475	Aa	7.1125	Aa	7.1327 a
Tallo	7.0425	Aa	7.1233	Aa	7.1650	Aa	7.1250	Aa	7.1133 a
Efecto Temperaturas de Extracción por Vapor									
				210 °C =	7.1082 A		220 °C =		7.1375 A
Efecto Periodos Tiempo de Extracción por Vapor									
				5.0 min =	7.1244 A		10.0 min =		7.1222 A
Comparaciones horizontales : Letras mayúsculas									
Comparaciones verticales : Letras minúsculas									

4.6.4. Determinación de Alcoholes Superiores (ppm Alcoholes Superiores)

En el **Anexo 3.4**, se reportan los datos experimentales obtenidos para la concentración de Alcoholes Superiores (ppm Alcoholes Superiores), correspondientes a muestras obtenidas de etanol a partir de los tratamientos en estudio.

En el análisis de varianza para la concentración de Alcoholes Superiores (ppm Alcoholes Superiores), **cuadro 4.13**, se aprecia que solo existe significación estadística para temperaturas de extracción por vapor, sin embargo no existe significación estadística para el tipo sustrato, periodo de tiempo de extracción por vapor e interacción de los mismos. El coeficiente de variabilidad fue 3.62 %.

Efecto Principal Tipo Sustrato.

En el **cuadro 4.14**, la Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad, visualiza que el sustrato hoja y tallo al haber obtenido 226.69 y 256.94 ppm Alcoholes Superiores, fueron estadísticamente diferentes, tal y como se muestra en el **gráfico 4.17**.

Efecto principal Temperaturas de Extracción por Vapor

Realizada la Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad, **cuadro 4.14**, se expresa que a temperatura de 210°C se obtuvo 199.24 ppm Alcoholes Superiores, y superó estadísticamente a la temperatura 220 °C que obtuvo 284.39 ppm Alcoholes Superiores, tal y como se muestra en el **gráfico 4.18**.

Efecto principal Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor

Efectuada la Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad, **cuadro 4.14**, se observó que con el tiempo de extracción por vapor 5.00 min se obtuvo 217.58 ppm Alcoholes Superiores, y superó estadísticamente al tiempo extracción por vapor 10.00 min que obtuvo 266.05 ppm Alcoholes Superiores, tal y como se muestra en el **gráfico 4.19**.

Efecto de la interacción Tipo de sustrato sobre la Temperatura de extracción y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor

Del análisis de la Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad, **cuadro 4.14**, se determinó que el efecto del Tipo de sustrato Hoja sobre Temperatura de extracción y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor se expresa que el tratamiento $S_1T_1P_1$ al lograr 159.99 ppm Alcoholes Superiores, supero estadísticamente a los tratamientos $S_1T_1P_2$ y $S_1T_2P_1$ que

obtuvieron 216.92 y 236.21 ppm Alcoholes Superiores, que superaron al tratamiento $S_1T_2P_2$ que obtuvo 293.65 ppm Alcoholes Superiores, respectivamente.

Para el efecto del Tipo de sustrato Tallo sobre Temperatura de extracción y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor se expresa que los tratamientos $S_2T_1P_1$ y $S_2T_1P_2$ al lograr 207.05 y 213.00 ppm Alcoholes Superiores, fueron estadísticamente iguales; y superaron de igual forma a los tratamiento $S_2T_2P_1$ y $S_2T_2P_2$ que lograron 267.07 y 340.64 ppm Alcoholes Superiores, ambos estadísticamente iguales.

Efecto de la interacción Temperatura de extracción y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor sobre el Tipo de sustrato

De la Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad, **cuadro 4.12**, se determinó que el efecto de la Temperatura de extracción y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor sobre el Tipo de sustrato, comparación vertical, que los tratamientos $S_1T_1P_1$ y $S_2T_1P_1$, $S_1T_1P_2$ y $S_2T_1P_2$, $S_2T_2P_1$ y $S_2T_2P_2$ y $S_1T_2P_1$ y $S_1T_2P_2$ al obtener 159.99 y 207.05, 216.92 y 213.00, 236.21 y 267.07, y 293.65 y 340.64 ppm Alcoholes Superiores, fueron estadísticamente iguales, respectivamente.

Efecto de la interacción Tipo de sustrato x Temperatura de extracción x Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor

Realizada la Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad, **cuadro 4.14**, se indica que la interacción entre Tipo de sustrato x Temperatura de extracción x Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor, en promedio el tratamiento $S_1T_1P_1$ al lograr 159.99 ppm Alcoholes Superiores supero estadísticamente a todos los tratamiento estudiados.

Según Villanueva (1997) reportado por Adanaqué (2009), el aceite fusel es una capa aceitosa que se forma en la fermentación y destilación, es una sustancia de alto punto de ebullición (90 a 125 °C), y está formado a partir de diferentes sustratos fermenticibles, por lo que concentración en baja debido a que en la destilación se llega como máximo a temperatura de 80°C. Por lo tanto al considerar a los alcoholes superiores una impureza del etanol, el mejor tratamiento fue el tratamiento $S_1T_1P_1$, tal y como se muestra en el **gráfico 4.20**.

Cuadro 4.13. Análisis de varianza para la concentración Alcoholes Superiores (ppm alcoholes superiores).

F. V.	S.C.	G.L.	C.M.	Fo.	Sign.
Tipo de sustrato	7319.2332	1	7319.2332	95.3161	**
Temperaturas de extracción por vapor (°C)	58007.3533	1	58007.3533	755.4115	**
Tiempo de extracción por vapor (min)	18794.3910	1	18794.3910	244.7535	**
Interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C))	601.9014	1	601.9014	7.8384	**
Interacción (Tipo de sustrato x Tiempo de extracción por vapor (min))	607.5073	1	607.5073	7.9114	**
Interacción (Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min))	2321.2700	1	2321.2700	30.2292	**
Interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min))	2252.4000	1	2252.4000	29.3323	**
Error	1842.9378	24	76.7891		
Total	91746.9939	31			

CV = 3.62%

Cuadro 4.14. Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad para los efectos principales Tipo de sustrato, Temperaturas de extracción por vapor (°C), Tiempo de extracción por vapor (min) e interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min)), sobre la concentración Alcoholes Superiores (ppm alcoholes superiores).

Factor B = Temperaturas de extracción por vapor										
Factor A = Tipo sustrato	210 °C				220 °C				Efecto Tipo Sustrato	
	Factor C = Tiempo de extracción por vapor				Factor C = Tiempo de extracción por vapor					
	5.0 min		10.0 min		5.0 min		10.0 min			
Hojas	159.99	Aa	216.92	Ba	236.21	Ba	293.65	Ca	226.69	a
Tallo	207.05	Aa	213.00	Aa	267.07	ABa	340.64	Ba	256.94	b
Efecto Temperaturas de Extracción por Vapor			210 °C = 199.24		A	220 °C = 284.39		B		
Efecto Periodos Tiempo de Extracción por Vapor			5.0 min = 217.58		A	10.0 min = 266.05		B		
Comparaciones horizontales			: Letras mayúsculas							
Comparaciones verticales			: Letras minúsculas							

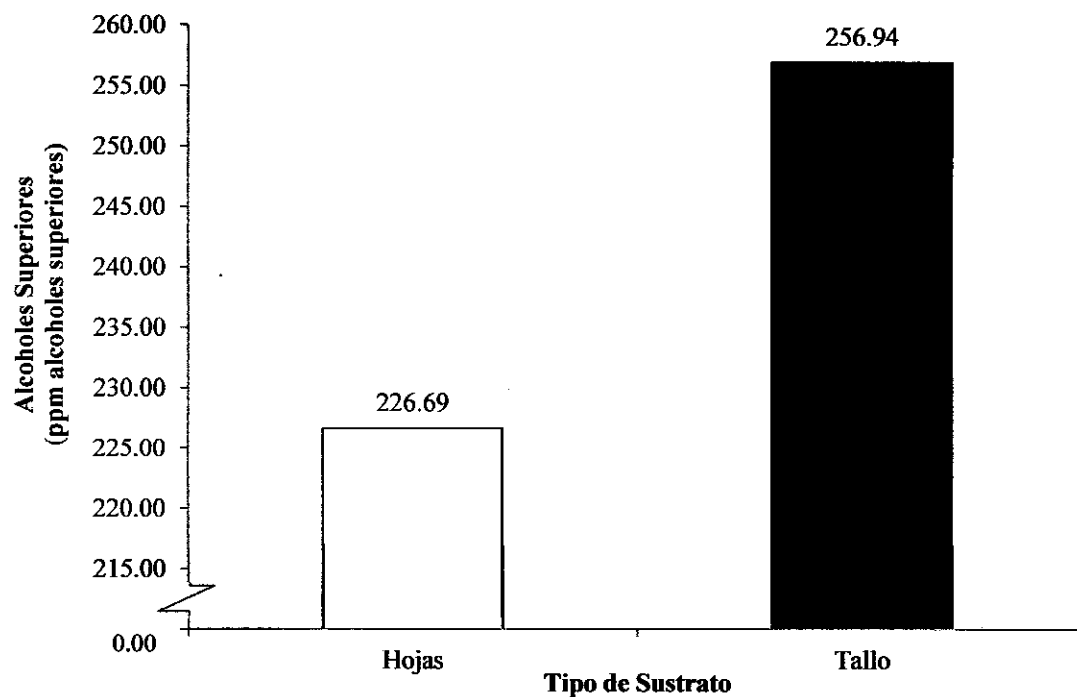


Gráfico 4.17. Efecto principal tipo de sustrato, sobre la concentración de alcoholes superiores (ppm alcoholes superiores) del etanol obtenido como producto.

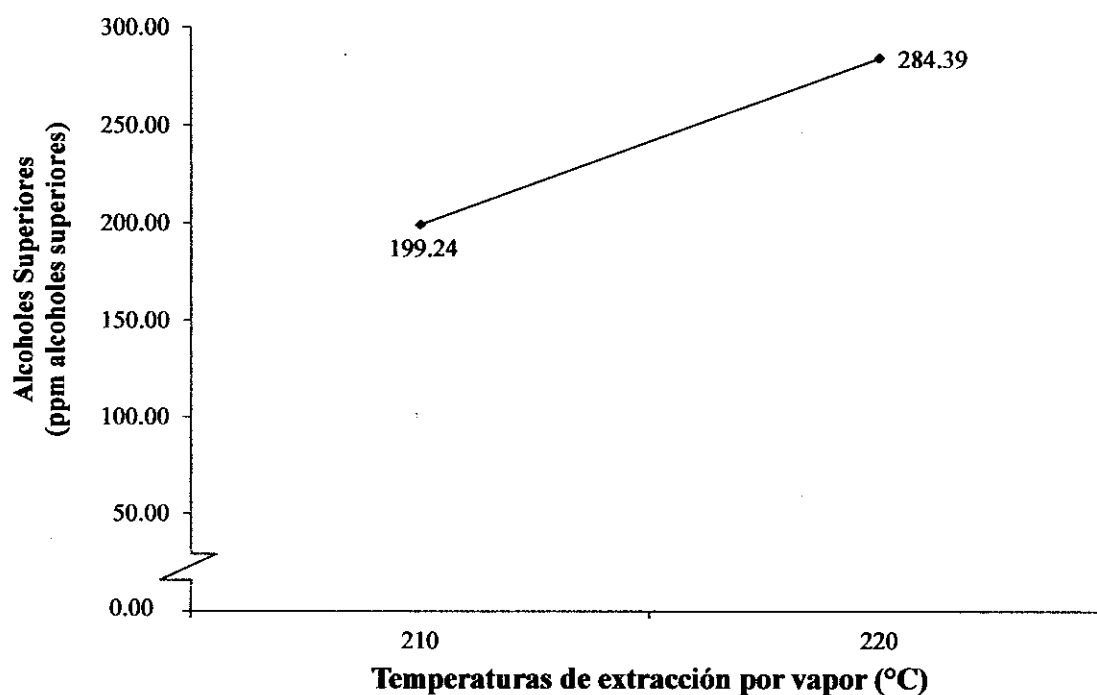


Gráfico 4.18. Efecto principal Temperaturas de extracción por vapor (°C), sobre la concentración de alcoholes superiores (ppm alcoholes superiores) del etanol obtenido como producto.

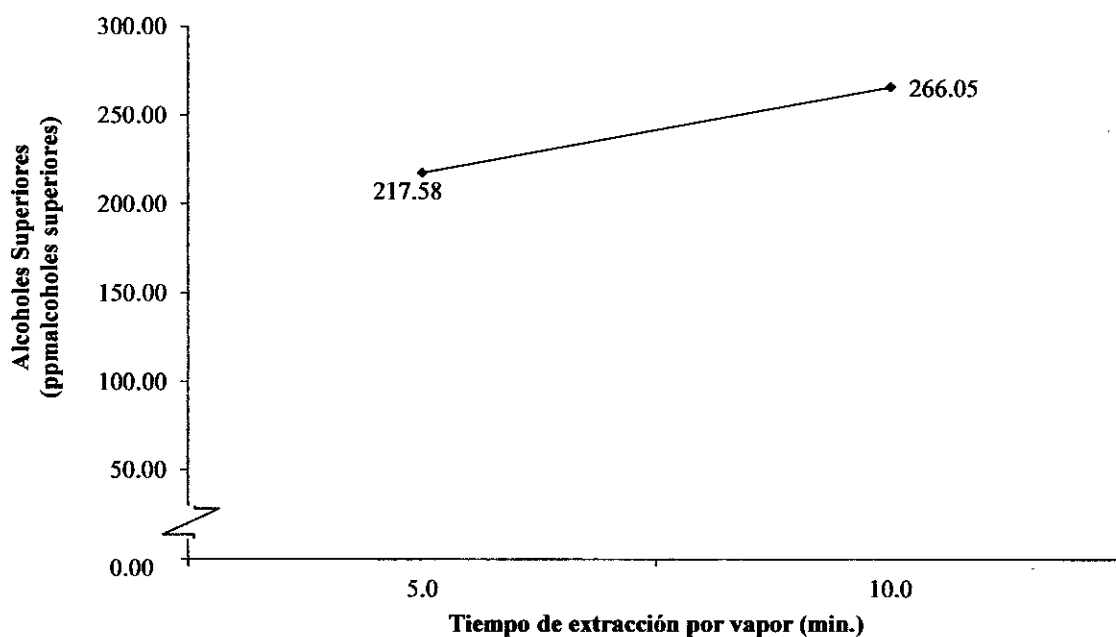


Gráfico 4.19. Efecto principal Tiempo de extracción por vapor (min.), sobre la concentración de Alcoholes Superiores (ppm alcoholes superiores) del etanol obtenido como producto.

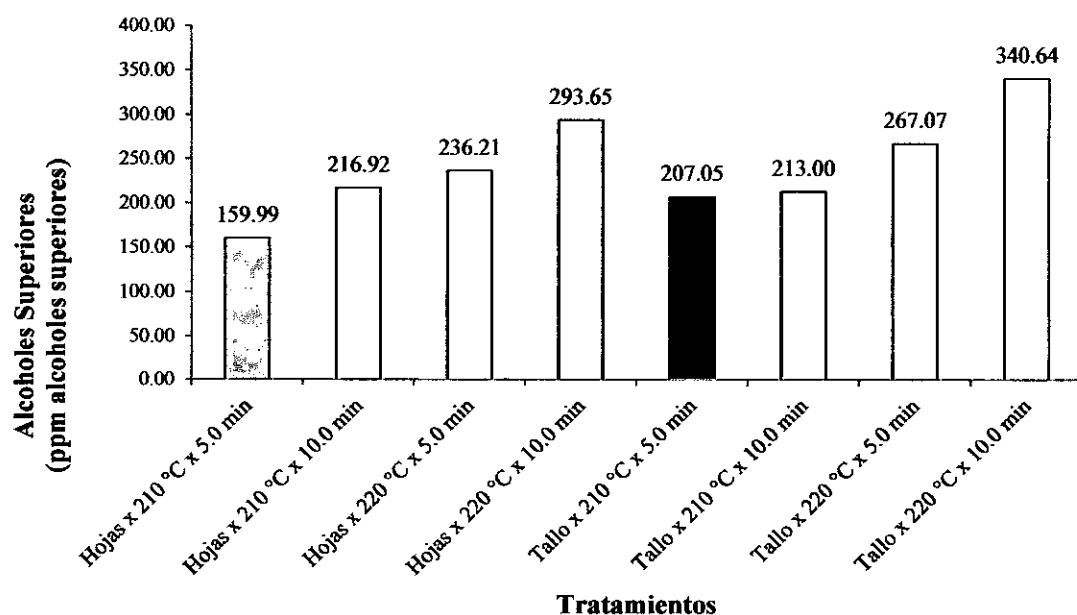


Gráfico 4.20. Efecto de la interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min)), sobre la concentración de Alcoholes Superiores (ppm alcoholes superiores) del etanol obtenido como producto.

4.6.5. Determinación de Aldehídos (ppm Furfural)

Jönsson *et al.*, (1998) menciona que como consecuencia de las altas temperaturas empleadas en los pre tratamientos, los azúcares originados en la hidrólisis, principalmente de la hemicelulosa, se degradan originando dos compuestos derivados del furano: el furfural, formado a partir de la degradación de las pentosas (xilosa y arabinosa) y el 5-hidroximetilfurfural (HMF), formado como consecuencia de la degradación de las hexosas (glucosa, manosa y galactosa).

Taherzadeh *et al.*, (2000b), entre los efectos producidos por el furfural sobre los microorganismos se encuentran: reducción de la tasa específica de crecimiento, disminución de la productividad volumétrica de etanol y disminución de la producción de biomasa. Palmqvist y col., (1998), la inhibición que el furfural ejerce sobre el alcohol deshidrogenasa podría explicar la excreción de acetaldehído observada durante las primeras horas de la fermentación en presencia de este derivado del furano. El furfural y el HMF son metabolizados tanto por bacterias como levaduras

En el **Anexo 3.5**, se reportan los datos experimentales obtenidos para la concentración de Alcoholes Superiores (ppm Alcoholes Superiores), del etanol obtenido en el estudio. El análisis de varianza, **cuadro 4.15**, se aprecia que solo existe alta significación estadística para tipo sustrato, temperaturas de extracción por vapor, periodo de tiempo de extracción por vapor e interacciones. El coeficiente de variabilidad fue 3.30 %.

Efecto Principal Tipo Sustrato.

El **cuadro 4.16**, de la Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad, visualiza que el sustrato hoja y tallo obtuvieron 6.05 y 6.06 ppm Furfural y fueron estadísticamente iguales.

Efecto principal Temperaturas de Extracción por Vapor

De efectuar la Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad, **cuadro 4.16** y **gráfico 4.20**, se indica que a temperatura de 210°C se obtuvo 5.98 ppm Furfural, y superó estadísticamente a la temperatura 220 °C que obtuvo 6.12 ppm Furfural, ver **gráfico 4.21**.

Efecto principal Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor

Realizada la Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad, **cuadro 4.16**, se expresa que con el tiempo extracción por vapor 5.00 y 10.00 min se obtuvo 6.04 y 6.07 ppm Furfural, y fueron estadísticamente iguales.

Efecto de la interacción Tipo de sustrato sobre la Temperatura de extracción y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor

El análisis de la Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad, **cuadro 4.16**, determino que el efecto del Tipo de sustrato Hoja sobre Temperatura de extracción y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor se expresa que el tratamiento $S_1T_1P_1$, $S_1T_1P_2$ y $S_1T_2P_2$ al lograr 5.97, 5.96 y 6.05 ppm Furfural, fueron estadísticamente iguales y superaron al tratamiento $S_1T_2P_1$ que obtuvo 6.22 ppm Furfural, respectivamente.

El sustrato Tallo sobre Temperatura de extracción y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor expresa que el tratamiento $S_2T_1P_1$ con 5.93 ppm Furfural, supero estadísticamente a los tratamientos $S_2T_1P_2$ y $S_2T_2P_1$ que obtuvieron 6.06 y 6.04 ppm Furfural que fueron iguales, y superaron al tratamiento $S_2T_2P_2$ que obtuvo 6.20 ppm Furfural.

Efecto de la interacción Temperatura de extracción y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor sobre el Tipo de sustrato

La Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad, **cuadro 4.16**, expresa que el efecto de la Temperatura de extracción y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor sobre el Tipo de sustrato, comparación vertical, que los tratamientos $S_1T_1P_1$ y $S_2T_1P_1$, $S_1T_1P_2$ y $S_2T_1P_2$, $S_2T_2P_1$ y $S_2T_2P_2$ y $S_1T_2P_1$ y $S_1T_2P_2$ al obtener 5.97 y 5.93, 5.96 y 6.06, 6.22 y 6.04, y 6.05 y 6.07 ppm Furfural, fueron estadísticamente iguales, respectivamente.

Efecto de la interacción Tipo de sustrato x Temperatura de extracción x Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor

De realizada la Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad, **cuadro 4.16**, se expresa que la interacción Tipo de sustrato x Temperatura de extracción x Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor en promedio el tratamiento $S_2T_1P_1$ al lograr 5.93 ppm Furfural, supero estadísticamente a todos los tratamiento estudiados.

Por lo tanto, según Kretzschmar (1961) reportado por Adanaqué (2009), al considerar el Furfural una impureza del etanol, los mejores tratamientos son $S_2T_1P_1$ tal y como se muestra en el **gráfico 4.22**.

Cuadro 4.15. Análisis de varianza para la concentración de aldehídos (ppm Furfural).

F. V.	S.C.	G.L.	C.M.	Fo.	Sign.
Tipo de sustrato	0.0006	1	0.0006	0.0152	NO
Temperaturas de extracción por vapor (°C)	0.1673	1	0.1673	4.2057	NO
Tiempo de extracción por vapor (min)	0.0059	1	0.0059	0.1477	NO
Interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C))	0.0037	1	0.0037	0.0930	NO
Interacción (Tipo de sustrato x Tiempo de extracción por vapor (min))	0.1065	1	0.1065	2.6781	NO
Interacción (Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min))	0.0082	1	0.0082	0.2068	NO
Interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min))	0.0201	1	0.0201	0.5067	NO
Error	0.9544	24	0.0398		
Total	1.2667	31			

CV = 3.30%

Cuadro 4.16. Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad para los efectos principales Tipo de sustrato, Temperaturas de extracción por vapor (°C), Tiempo de extracción por vapor (min) e interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min)), sobre la concentración de aldehídos (ppm Furfural).

Factor B = Temperaturas de extracción por vapor									
Factor A = Tipo sustrato	210 °C				220 °C				Efecto Tipo Sustrato
	Factor C = Tiempo de extracción por vapor				Factor C = Tiempo de extracción por vapor				
	5.0 min		10.0 min		5.0 min		10.0 min		
Hojas	5.97	Aa	5.96	A a	6.22	Ba	6.05	Aa	6.05 a
Tallo	5.93	Aa	6.06	B a	6.04	Ba	6.20	Ca	6.06 a
Efecto Temperaturas de Extracción por Vapor			210 °C =	5.98 A	220 °C =			6.12 B	
Efecto Periodos Tiempo de Extracción por Vapor			5.0 min =	6.04 A	10.0 min =			6.07 A	

Comparaciones horizontales : Letras mayúsculas

Comparaciones verticales : Letras minúsculas

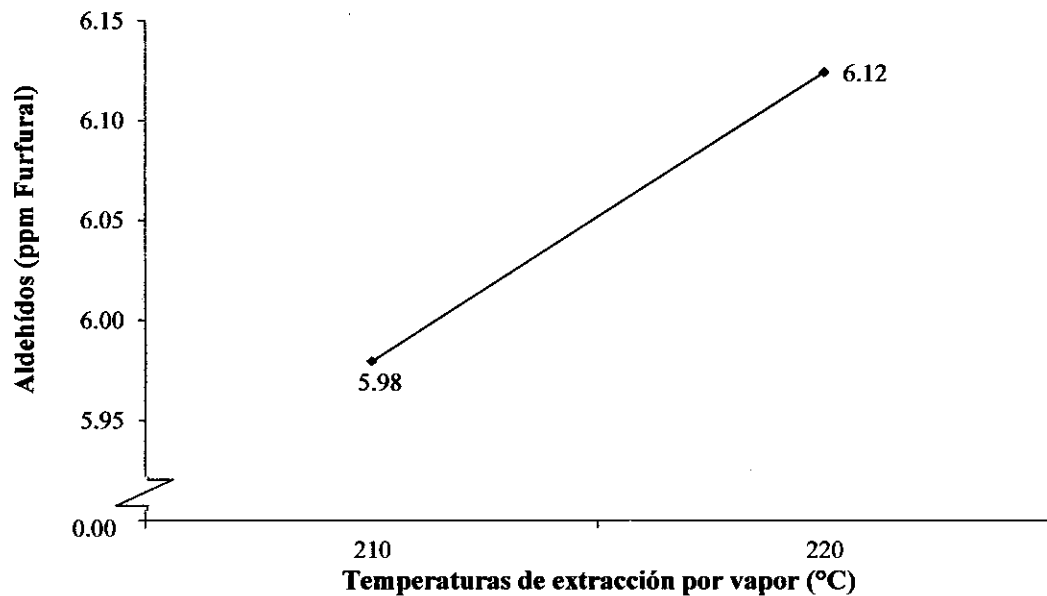


Gráfico 4.21. Efecto principal Temperaturas de extracción por vapor (°C), sobre la concentración de aldehídos (ppm Furfural) del etanol obtenido como producto.

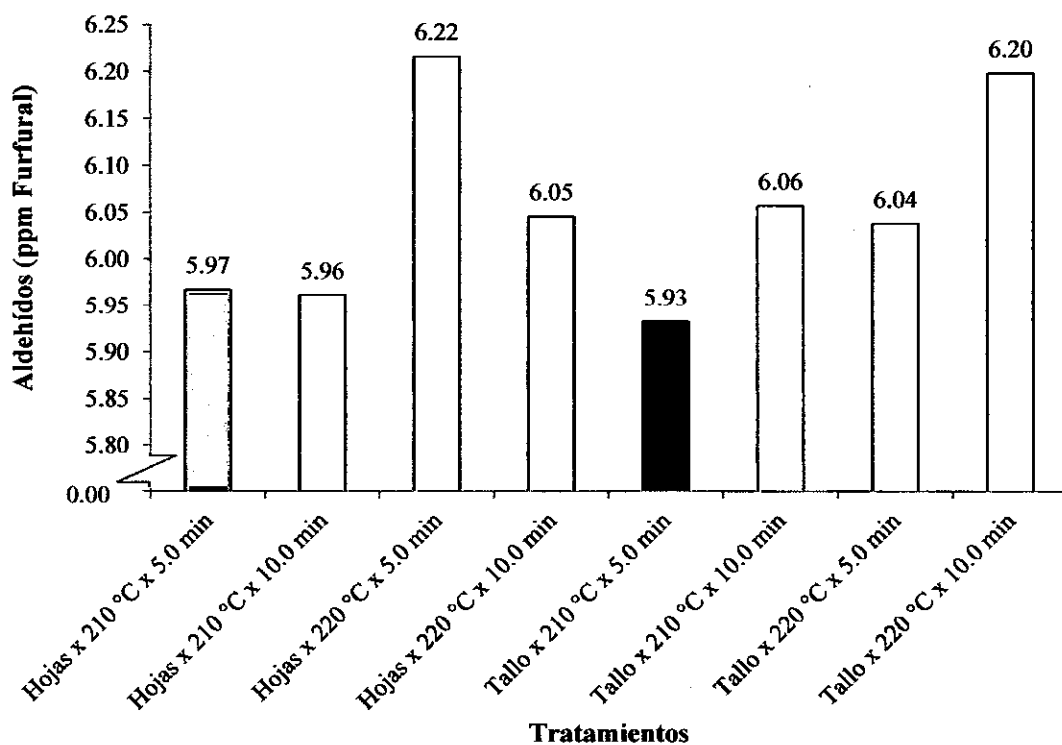


Gráfico 4.22. Efecto de la interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min)), sobre la concentración de aldehídos (ppm Furfural) del etanol obtenido como producto.

4.6.6. Determinación de Acidez (mg Ácido Acético.L Alcohol Anhidro⁻¹)

Los anexos 3.6 y 3.7, reportan los datos experimentales obtenidos para la concentración de Acidez (mg Ácido Acético . L Alcohol Anhidro⁻¹), correspondientes a muestras obtenidas de etanol a partir de los tratamientos en estudio.

En el análisis de varianza para la concentración de Acidez (mg Ácido Acético . L Alcohol Anhidro⁻¹), **cuadro 4.17**, se aprecia que solo existe alta significación estadística para las temperaturas de extracción por vapor y el periodo de tiempo de extracción por vapor. El coeficiente de variabilidad fue 9.01 %.

Efecto Principal Tipo Sustrato.

Efectuada la Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad, **cuadro 4.18**, se visualiza que el sustrato hoja y tallo al haber obtenido 50.5552 y 51.5664 mg Ácido Acético . L Alcohol Anhidro⁻¹, fueron estadísticamente iguales.

Efecto principal Temperaturas de Extracción por Vapor

Realizada la Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad, **cuadro 4.18**, se determinó que a temperatura de 210°C se obtuvo 43.4221 mg Ácido Acético . L Alcohol Anhidro⁻¹, y superó estadísticamente a la temperatura 220 °C que obtuvo 58.6995 mg Ácido Acético . L Alcohol Anhidro⁻¹, ver **gráfico 4.23**

Efecto principal Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor

La Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad, **cuadro 4.18 y gráfico 4.24**, indica que con el tiempo extracción por vapor 5.00 min se obtuvo 45.7416 mg Ácido Acético.L Alcohol Anhidro⁻¹, y superó estadísticamente al tiempo extracción por vapor 10.00 min que obtuvo 56.3800 mg Ácido Acético.L Alcohol Anhidro⁻¹.

Efecto de la interacción Tipo de sustrato sobre la Temperatura de extracción y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor

Del análisis de la Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad, **cuadro 4.18**, y al estudiar el efecto del Tipo de sustrato Hoja sobre Temperatura de extracción y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor se expresa que el tratamiento S₁T₁P₁ al lograr 34.1065 mg Ácido Acético . L Alcohol Anhidro⁻¹, supero estadísticamente a los tratamientos S₁T₁P₂, S₁T₂P₁

y $S_1T_2P_2$ que obtuvieron 52.7548, 54.8118 y 60.5475 mg Ácido Acético.L Alcohol Anhidro⁻¹ y fueron estadísticamente iguales, respectivamente.

El efecto del Tipo de sustrato Tallo sobre Temperatura de extracción y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor se expresa que el tratamiento $S_2T_1P_1$ al lograr 38.9384 mg Ácido Acético . L Alcohol Anhidro⁻¹, supero estadísticamente a los tratamientos $S_2T_1P_2$ y $S_2T_2P_1$ que obtuvieron 47.8885 y 55.1096 mg Ácido Acético . L Alcohol Anhidro⁻¹ que fueron iguales, y al tratamiento $S_2T_2P_2$ que obtuvo 64.3290 mg Ácido Acético . L Alcohol Anhidro⁻¹.

Efecto de la interacción Temperatura de extracción y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor sobre el Tipo de sustrato

El análisis de la Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad, **cuadro 4.18**, expresa que el efecto de la Temperatura de extracción y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor sobre el Tipo de sustrato, en comparación vertical indica que los tratamientos $S_1T_1P_1$ y $S_2T_1P_1$, $S_1T_1P_2$ y $S_2T_1P_2$, $S_1T_2P_1$ y $S_2T_2P_1$; y $S_1T_2P_2$ y $S_2T_2P_2$ al obtener 34.1065 y 38.9384, 52.7548 y 47.8885, 54.8118 y 55.1096; 60.5475 y 64.3290 mg Ácido Acético . L Alcohol Anhidro⁻¹, fueron estadísticamente iguales.

Efecto de la interacción Tipo de sustrato x Temperatura de extracción x Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor

En el **cuadro 4.18**, de la Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad, la interacción entre Tipo de sustrato x Temperatura de extracción x Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor se expresa que en promedio el tratamiento $S_1T_1P_1$ y $S_2T_1P_1$ al lograr 34.1065 y 38.9384 mg Ácido Acético.L Alcohol Anhidro⁻¹ supero a los demás tratamiento estudiados.

Para Tomas et al (2009), el ácido acético, originado a partir de la hidrólisis de los grupos acetilo de la fracción hemicelulósica, fue el compuesto mayoritario en todos los casos. Su concentración aumentó cuanto mayor fue la temperatura de pretratamiento.Por lo tanto, teniendo en cuenta lo reportado por Kretzschmar (1961) mencionado por Adanaqué (2009), al considerar al ácido acético una impureza del etanol, el mejor tratamientos es $S_1T_1P_1$, tal y como se muestra en el **gráfico 4.25**.

Cuadro 4.17. Análisis de varianza para la acidez (mg Ácido Acético.L Alcohol Anhidro⁻¹).

F. V.	S.C.	G.L.	C.M.	Fo.	Sign.
Tipo de sustrato	8.1804	1	8.1804	0.3865	NO
Temperaturas de extracción por vapor (°C)	1867.1923	1	1867.1923	88.2080	**
Tiempo de extracción por vapor (min)	905.3987	1	905.3987	42.7719	**
Interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C))	8.4615	1	8.4615	0.3997	NO
Interacción (Tipo de sustrato x Tiempo de extracción por vapor (min))	19.3104	1	19.3104	0.9122	NO
Interacción (Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min))	79.9268	1	79.9268	3.7758	NO
Interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min))	86.8811	1	86.8811	4.1043	NO
Error	508.0337	24	21.1681		
Total	3483.3849	31			
			CV =	9.01%	

Cuadro 4.18. Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad para los efectos principales Tipo de sustrato, Temperaturas de extracción por vapor (°C), Tiempo de extracción por vapor (min) e interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min)), sobre la acidez (mg Ácido Acético.L Alcohol Anhidro⁻¹).

Factor A = Tipo sustrato		Factor B = Temperaturas de extracción por vapor								Efecto Tipo Sustrato
		210 °C				220 °C				
		Factor C = Tiempo de extracción por vapor				Factor C = Tiempo de extracción por vapor				
		5.0 min		10.0 min		5.0 min		10.0 min		
Hojas		34.1065	Aa	52.7548	Ba	54.8118	B a	60.5475	Ba	50.5552 a
Tallo		38.9384	Aa	47.8885	Ba	55.1096	BC a	64.3290	Ca	51.5664 a
Efecto Temperaturas de Extracción por Vapor					210 °C =	43.4221	A	220 °C =	58.6995	B
Efecto Periodos Tiempo de Extracción por Vapor					5.0 min =	45.7416	A	10.0 min =	56.3800	B
Comparaciones horizontales : Letras mayúsculas										
Comparaciones verticales : Letras minúsculas										

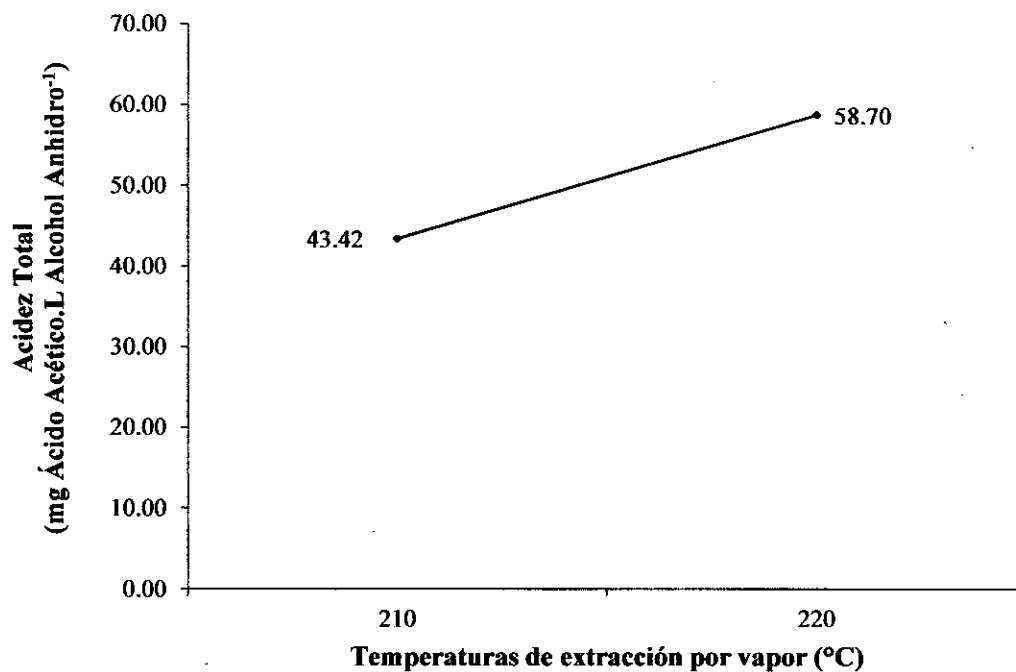


Gráfico 4.23. Efecto principal Temperaturas de extracción por vapor (°C), sobre la Acidez Total (mg Ácido Acético.L Alcohol Anhidro⁻¹), del etanol obtenido como producto.

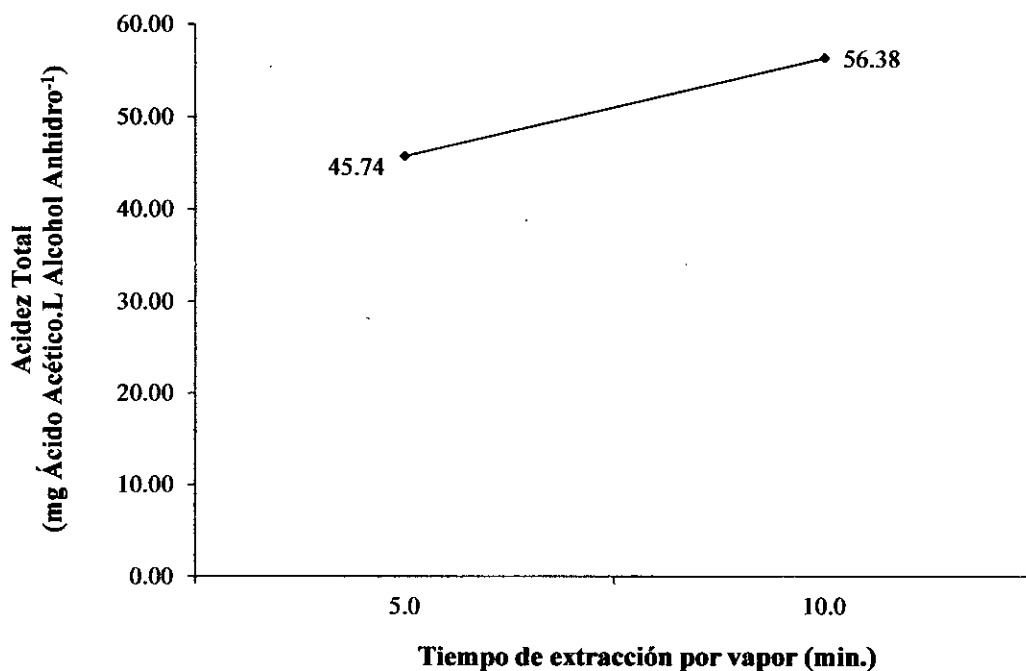


Gráfico 4.24. Efecto principal Tiempo de extracción por vapor (min.), sobre la Acidez Total (mg Ácido Acético.L Alcohol Anhidro⁻¹), del etanol obtenido como producto.

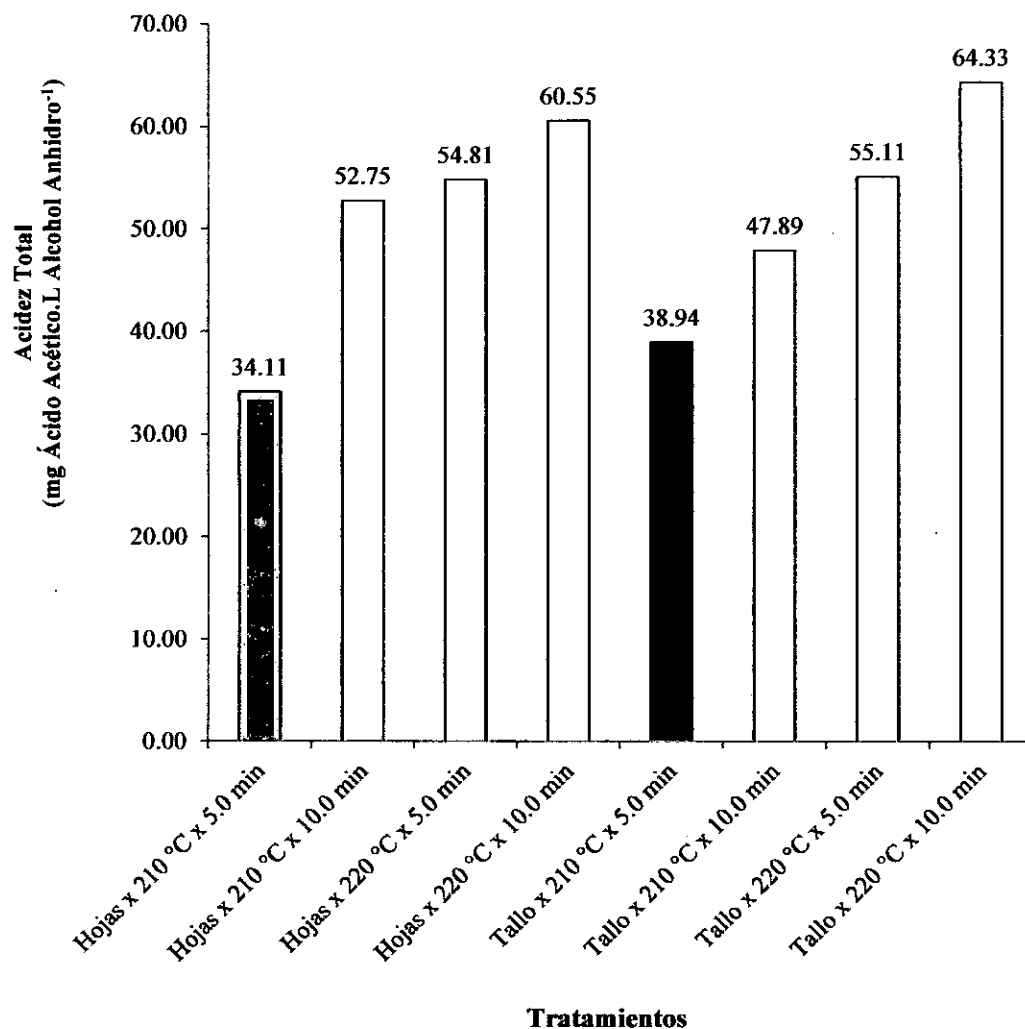


Gráfico 4.25. Efecto de la interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min)), sobre la acidez total (mg Ácido Acético.L Alcohol Anhidro⁻¹) del etanol obtenido como producto.

4.6.7. Determinación de Esteres (ppm Acetato de Etilo)

El **Anexo 3.8**, reporta los datos experimentales obtenidos para la concentración de Esteres (ppm Acetato de Etilo), correspondientes a muestras obtenidas de etanol a partir de los tratamientos en estudio.

En el análisis de varianza para la concentración de Esteres (ppm Acetato de Etilo), **cuadro 4.19**, se aprecia que solo existe alta significación estadística para Temperaturas de extracción por vapor y Tiempo de extracción por vapor. El coeficiente de variabilidad fue 4.36 %.

Efecto Principal Tipo Sustrato.

En el **cuadro 4.20**, de la Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad, se visualiza que el sustrato hoja y tallo al haber obtenido 282.05 y 280.81 ppm Acetato de Etilo, fueron estadísticamente iguales.

Efecto principal Temperaturas de Extracción por Vapor

De efectuar la Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad, **cuadro 4.20 y gráfico 4.26**, se indica que a temperatura de 210°C se obtuvo 261.63 ppm Acetato de Etilo, y superó estadísticamente a la temperatura 220 °C que obtuvo 301.22 ppm Acetato de Etilo.

Efecto principal Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor

Realizada la Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad, **cuadro 4.20**, se indica que con el tiempo extracción por vapor 5.00 min se obtuvo 273.31 ppm Acetato de Etilo, y superó estadísticamente al tiempo extracción por vapor 10.00 min que obtuvo 289.55 ppm Acetato de Etilo. Tal y como se muestra en el **gráfico 4.27**

Efecto de la interacción Tipo de sustrato sobre la Temperatura de extracción y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor

Efectuada la Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad, **cuadro 4.20**, expresa el efecto del Tipo de sustrato Hoja sobre Temperatura de extracción y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor, que el tratamiento $S_1T_1P_1$ al lograr 262.88 ppm Acetato de Etilo, fue estadísticamente igual al tratamientos $S_1T_1P_2$ que obtuvo 270.39 ppm Acetato de Etilo, y supero a los tratamientos $S_1T_2P_1$ y $S_1T_2P_2$ que obtuvieron 289.54 y 305.37 ppm Acetato de Etilo.

Para el efecto del Tipo de sustrato Tallo sobre Temperatura de extracción y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor se expresa que los tratamientos $S_2T_1P_1$ y $S_2T_1P_2$ al lograr 250.18 y 263.06 ppm Acetato de Etilo, fueron estadísticamente iguales; y superaron de igual forma a los tratamiento $S_2T_2P_1$ y $S_2T_2P_2$ que lograron 290.63 y 319.36 ppm Acetato de Etilo, ambos estadísticamente iguales.

Efecto de la interacción Temperatura de extracción y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor sobre el Tipo de sustrato

Realizada la Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad, **cuadro 4.20**, se indica que el efecto de la Temperatura de extracción y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor sobre el Tipo de sustrato se indica en la comparación vertical que los tratamientos $S_2T_1P_1$ y $S_1T_2P_2$ al obtener 250.18 y 305.37 ppm Acetato de Etilo, superaron estadísticamente a los tratamientos $S_1T_1P_1$ y $S_2T_2P_2$ con 262.88 y 319.36 ppm Acetato de Etilo; sin embargo la parejas de tratamiento $S_1T_1P_2$ y $S_2T_1P_2$; y $S_1T_2P_1$ y $S_2T_2P_1$ que obtuvieron 270.39 y 263.06; y 289.54 y 290.63 ppm Acetato de Etilo resultaron estadísticamente iguales.

Efecto de la interacción Tipo de sustrato x Temperatura de extracción x Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor

De la Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad, **cuadro 4.20**, se determinó que la interacción entre Tipo de sustrato x Temperatura de extracción x Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor, en promedio que el tratamiento $S_2T_1P_1$ al lograr 250.18 ppm Acetato de Etilo, supero estadísticamente a todos los tratamiento estudiados.

El acetato de metilo y etilo son ésteres de mayor proporción ascienden y son arrastrados con el producto debido a su temperatura de ebullición es de 57 y 77°C, respectivamente (Fasset 1983); y que son sales alcohólicas, tanto de ácidos orgánicos como inorgánicos y su mayor producción es a partir de alcohol etílico (Rankine 1995). También es posible que se haya arrastrado la totalidad de ésteres. Por lo tanto, teniendo en cuenta lo reportado por Kretzschmar (1961), al considerar a los esterres una impureza del etanol, el mejor tratamiento es $S_2T_1P_1$, tal y como se muestra en el **gráfico 4.28**.

Cuadro 4.19. Análisis de varianza para la concentración de esteres (ppm Acetato de Etilo).

F. V.	S.C.	G.L.	C.M.	Fo.	Sign.
Tipo de sustrato	12.2845	1	12.2845	0.0815	NO
Temperaturas de extracción por vapor (°C)	12541.9410	1	12541.9410	83.1597	**
Tiempo de extracción por vapor (min)	2110.0295	1	2110.0295	13.9906	**
Interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C))	616.3656	1	616.3656	4.0868	NO
Interacción (Tipo de sustrato x Tiempo de extracción por vapor (min))	167.1617	1	167.1617	1.1084	NO
Interacción (Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min))	291.8041	1	291.8041	1.9348	NO
Interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min))	28.3775	1	28.3775	0.1882	NO
Error	3619.6217	24	150.8176		
Total	19387.5855	31			

CV = 4.36 %

Cuadro 4.20. Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad para los efectos principales Tipo de sustrato, Temperaturas de extracción por vapor (°C), Tiempo de extracción por vapor (min) e interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min)), sobre la concentración de esteres (ppm Acetato de Etilo).

Factor B = Temperaturas de extracción por vapor									
Factor A = Tipo sustrato	210 °C				220 °C				Efecto Tipo Sustrato
	Factor C = Tiempo de extracción por vapor				Factor C = Tiempo de extracción por vapor				
	5.0 min		10.0 min		5.0 min		10.0 min		
Hojas	262.88	A b	270.39	ABa	289.54	BCa	305.37	Ca	282.05 a
Tallo	250.18	Aa	263.06	A a	290.63	B a	319.36	Bb	280.81 a
Efecto Temperaturas de Extracción por Vapor			210 °C =	261.63 A	220 °C =	301.22 B			
Efecto Periodos Tiempo de Extracción por Vapor			5.0 min =	273.31 A	10.0 min =	289.55 B			
Comparaciones horizontales			: Letras mayúsculas						
Comparaciones verticales			: Letras minúsculas						

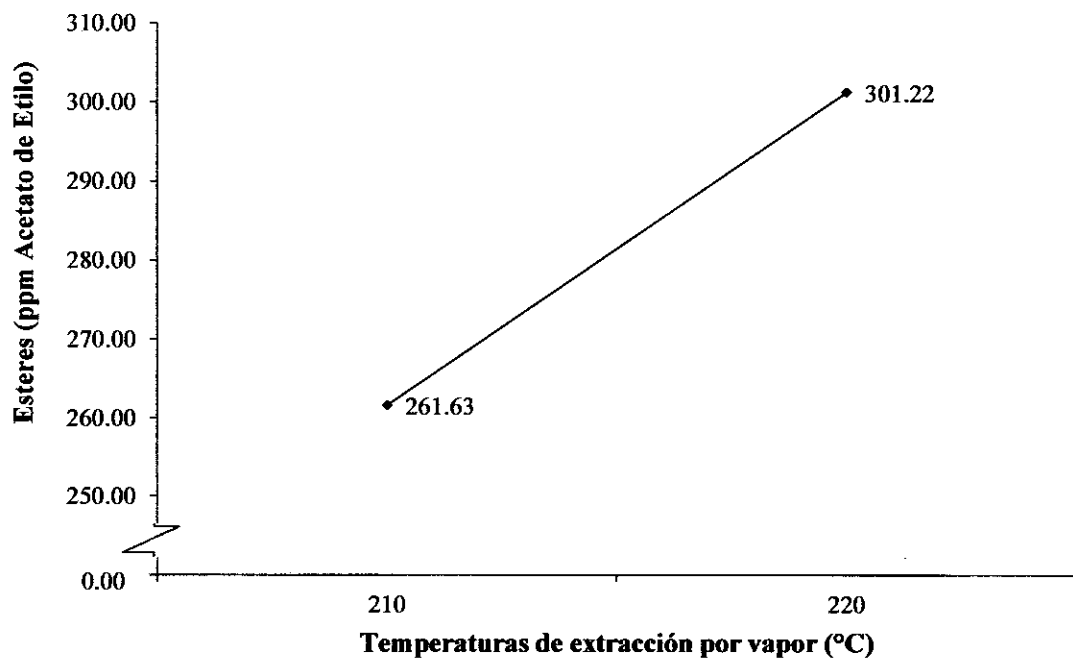


Gráfico 4.26. Efecto principal Temperaturas de extracción por vapor (°C), sobre la concentración de esteres (ppm Acetato de Etilo) del etanol obtenido como producto.

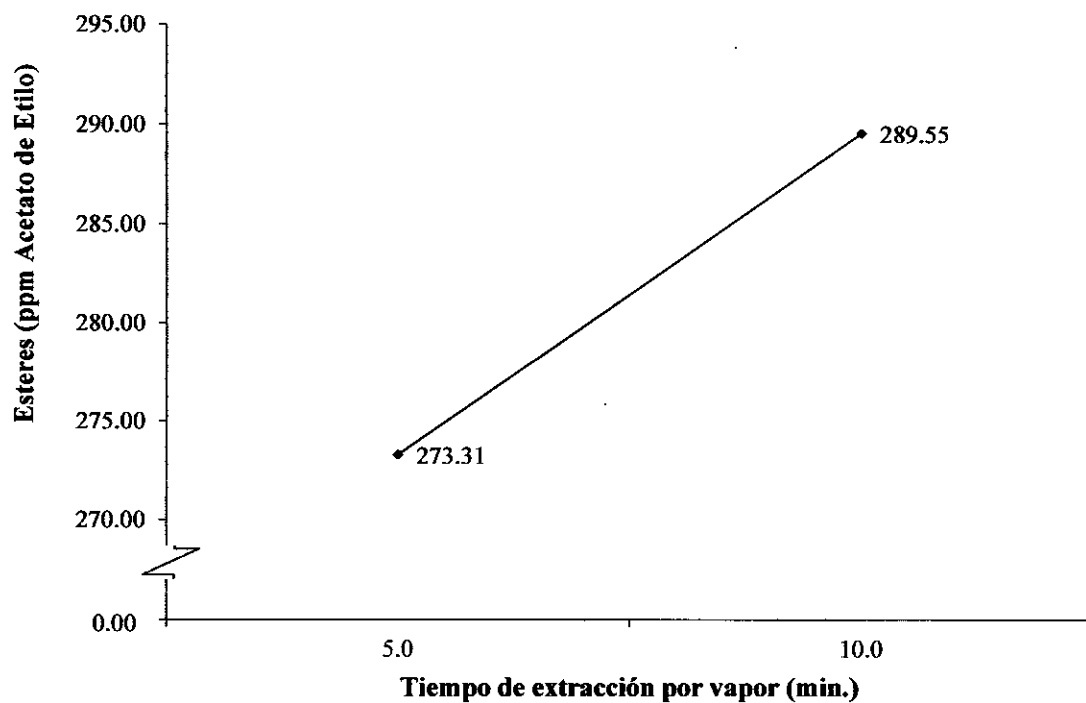


Gráfico 4.27. Efecto principal Tiempo de extracción por vapor (min.), sobre la concentración de esteres (ppm Acetato de Etilo), del etanol obtenido como producto.

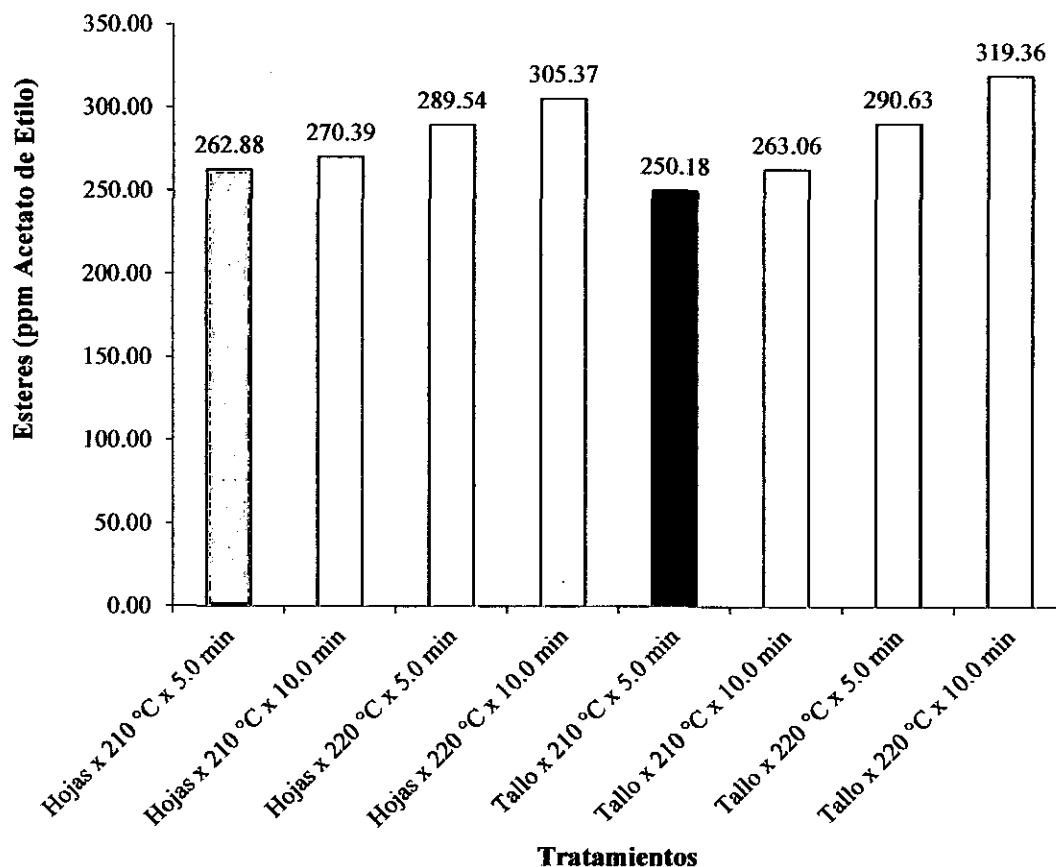


Gráfico 4.28. Efecto de la interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min)), sobre la concentración de esteres (ppm Acetato de Etilo) del etanol obtenido como producto

4.6.8.Determinación de Metanol (ppm metanol)

El **Anexo 3.9**, se reporta los datos experimentales obtenidos para la concentración de Metanol (ppm metanol), para las muestras obtenidas de etanol a partir de los tratamientos en estudio.

En el **cuadro 4.21**, el análisis de varianza para la concentración de Metanol (ppm metanol), se aprecia que existe alta significación estadística para el Tipo sustrato, Temperaturas de extracción por vapor y la interacción Tipo sustrato x Temperaturas de extracción por vapor. El coeficiente de variabilidad fue 26.00 %.

Efecto Principal Tipo Sustrato.

En el **cuadro 4.22**, de la Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad, se visualiza que el sustrato hoja al haber obtenido 31.77 ppm metanol, superó estadísticamente al sustrato tallo que obtuvo 247.88 ppm metanol, tal y como se muestra en el **gráfico 4.29**.

Efecto principal Temperaturas de Extracción por Vapor

En la Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad, **cuadro 4.22 y gráfico 4.30**, se indica que a temperatura de 210°C se obtuvo 95.12 ppm metanol, y superó estadísticamente a la temperatura 220 °C que obtuvo 181.53 ppm metanol.

Efecto principal Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor

Realizada la Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad, **cuadro 4.22**, se indica que con el tiempo extracción por vapor 5.00 min se obtuvo 132.33 ppm metanol, y superó estadísticamente al tiempo extracción por vapor 10.00 min que obtuvo 147.32 ppm metanol y se visualiza en el **gráfico 4.31**

Efecto de la interacción Tipo de sustrato sobre la Temperatura de extracción y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor

En la Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad, **cuadro 4.22**, indica que el efecto del Tipo de sustrato Hoja sobre Temperatura de extracción y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor se expresa que el tratamiento $S_1T_1P_1$, $S_1T_1P_2$, $S_1T_2P_1$ y $S_1T_2P_2$ al lograr 27.60, 31.37, 31.52 y 36.58 ppm metano, fueron estadísticamente iguales.

Para el efecto del Tipo de sustrato Tallo sobre Temperatura de extracción y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor se expresa que el tratamiento $S_2T_1P_1$ al lograr 175.45

ppm metano igualo estadísticamente al tratamiento $S_2T_1P_2$ que obtuvo 158.06 ppm metano, y supero a los tratamientos $S_2T_2P_1$ y $S_2T_2P_2$ que obtuvieron 294.76 y 363.27 ppm metano, estos tres últimos iguales respectivamente.

Efecto de la interacción Temperatura de extracción y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor sobre el Tipo de sustrato

Del análisis de la Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad, **cuadro 4.22**, se indica que el efecto de la Temperatura de extracción y Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor sobre el Tipo de sustrato, en la comparación vertical que los tratamientos $S_1T_1P_1$, $S_1T_1P_2$, $S_1T_2P_1$ y $S_1T_2P_2$ al obtener 27.60, 31.37, 31.52 y 36.58 ppm metano superaron estadísticamente a los tratamientos $S_2T_1P_1$, $S_2T_1P_2$, $S_2T_2P_1$ y $S_2T_2P_2$ que obtuvieron 175.45, 158.06, 294.76 y 363.27 ppm metano.

Efecto de la interacción Tipo de sustrato x Temperatura de extracción x Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor

El análisis de la Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad, **cuadro 4.22**, se indica que la interacción entre Tipo de sustrato x Temperatura de extracción x Periodo de Tiempo de Extracción por Vapor, que en promedio el tratamiento $S_1T_1P_1$ al lograr 27.60 ppm metano supero a todos los tratamiento estudiados.

Según Matissek (1998) reportado por Adanaqué (2009), sostiene que cuando se fermentan mostos sin filtrar (presencia de madera) el contenido de metanol es mayor y porque estos se forman a partir de pectinas. Por esto es que hay presencia de metanol en los tratamientos pero cuando se concentran, las pectinas sufren modificaciones o desnaturalización, ya que sufren hidrólisis. El bajo contenido de metanol se puede deber a que la destilación se realizó a 78.4 °C, que es la temperatura de ebullición del etanol, y esta temperatura es mayor a la temperatura de ebullición del metanol que es 64.5 °C y tiene mayor valor de volatilidad que el etanol.

Por lo tanto, teniendo en cuenta lo reportado por Kretzschmar (1961), al considerar al metanol una impureza del etanol, el mejor tratamientos es $S_1T_1P_1$, tal y como se muestra en el **gráfico 4.32**.

Cuadro 4.21. Análisis de varianza para la concentración metanol (ppm metanol).

F. V.	S.C.	G.L.	C.M.	Fo.	Sign.
Tipo de sustrato	373645.9361	1	373645.9361	282.6768	**
Temperaturas de extracción por vapor (°C)	55661.3703	1	55661.3703	42.1099	**
Tiempo de extracción por vapor (min)	1796.7405	1	1796.7405	1.3593	NO
Interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C))	49739.5457	1	49739.5457	37.6298	**
Interacción (Tipo de sustrato x Tiempo de extracción por vapor (min))	894.8602	1	894.8602	0.6770	NO
Interacción (Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min))	3800.1964	1	3800.1964	2.8750	NO
Interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min))	3579.5197	1	3579.5197	2.7080	NO
Error	31723.5218	24	1321.8134		
Total	520841.691	31			
CV = 26.00%					

Cuadro 4.22. Prueba de Duncan 0.05 de probabilidad para los efectos principales Tipo de sustrato, Temperaturas de extracción por vapor (°C), Tiempo de extracción por vapor (min) e interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min)), sobre la concentración metanol (ppm metanol)

Factor B = Temperaturas de extracción por vapor										
Factor A =		210 °C				220 °C				Efecto
Tipo	Factor C = Tiempo de extracción					Factor C = Tiempo de				Tipo
sustrato	por vapor					extracción por vapor				Sustrato
	5.0 min	10.0 min			5.0 min	10.0 min				
Hojas	27.60 Aa	31.37 Aa			31.52 A a	36.58 Aa			31.77 a	
Tallo	175.45 A b	158.06 AB b			294.76 B b	363.27 B b			247.88 b	
Efecto Temperaturas de Extracción por Vapor		210 °C = 98.12 A				220 °C = 181.53 B				
Efecto Periodos Tiempo de Extracción por Vapor		5.0 min = 132.33 A				10.0 min = 147.32 B				
Comparaciones horizontales		: Letras mayúsculas								
Comparaciones verticales		: Letras minúsculas								

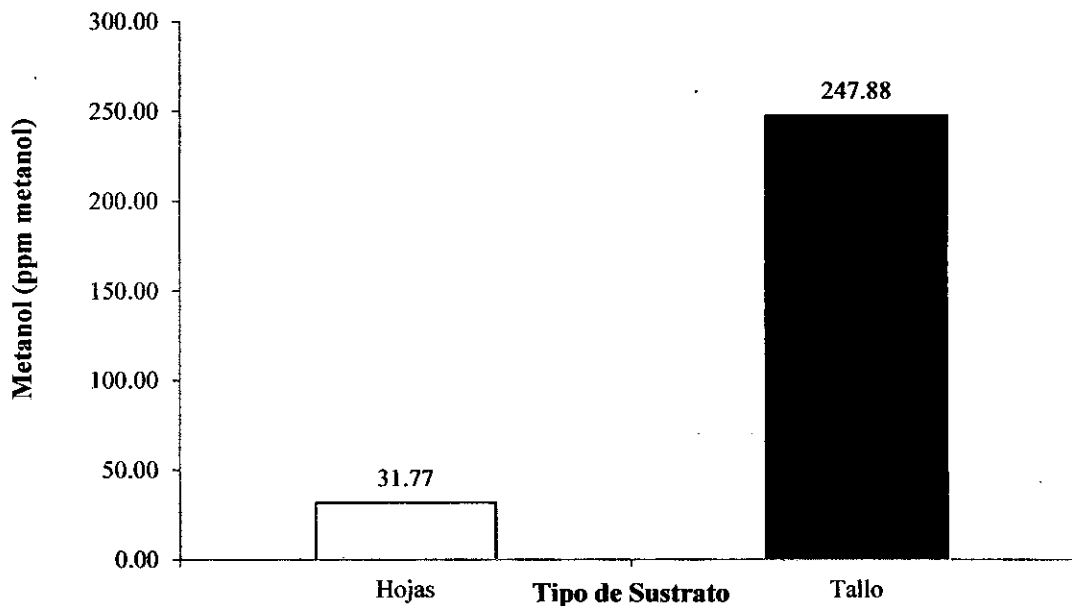


Gráfico 4.29. Efecto principal tipo de sustrato, sobre la concentración de metanol (ppm metanol) del etanol obtenido como producto.

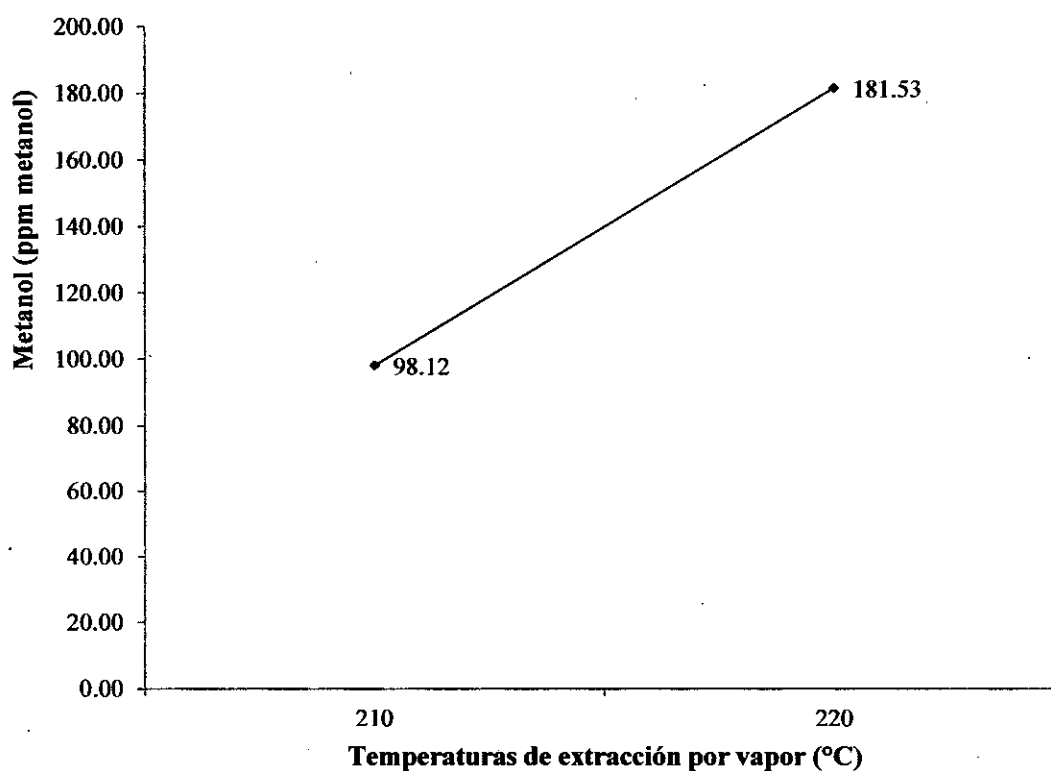


Gráfico 4.30. Efecto principal Temperaturas de extracción por vapor (°C), sobre la concentración de metanol (ppm metanol) del etanol obtenido como producto.

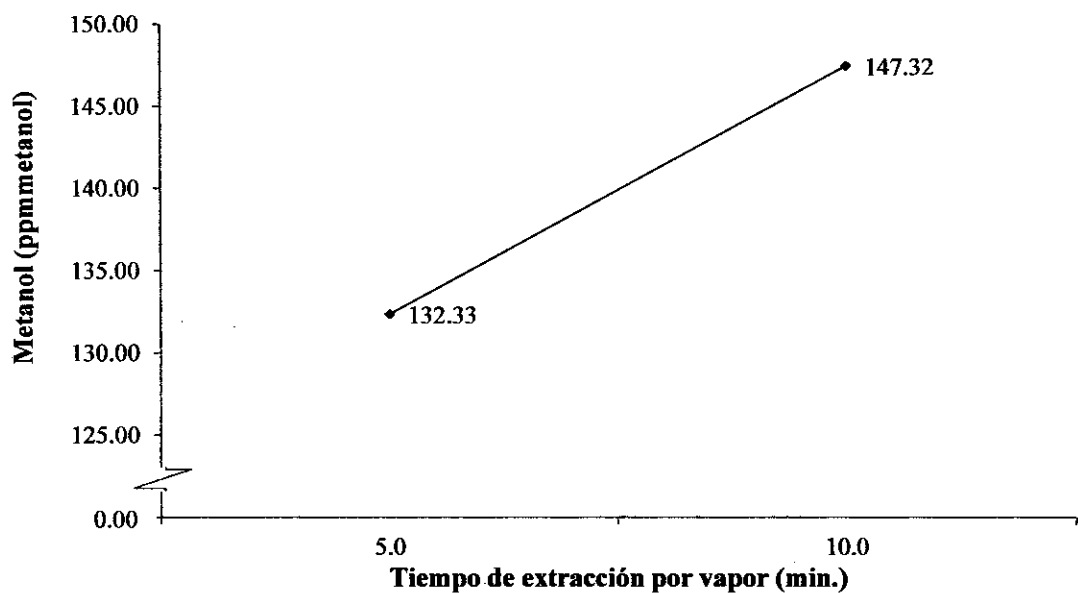


Gráfico 4.31. Efecto principal Tiempo de extracción por vapor (min.), sobre la concentración de metanol (ppm metanol) del etanol obtenido como producto.

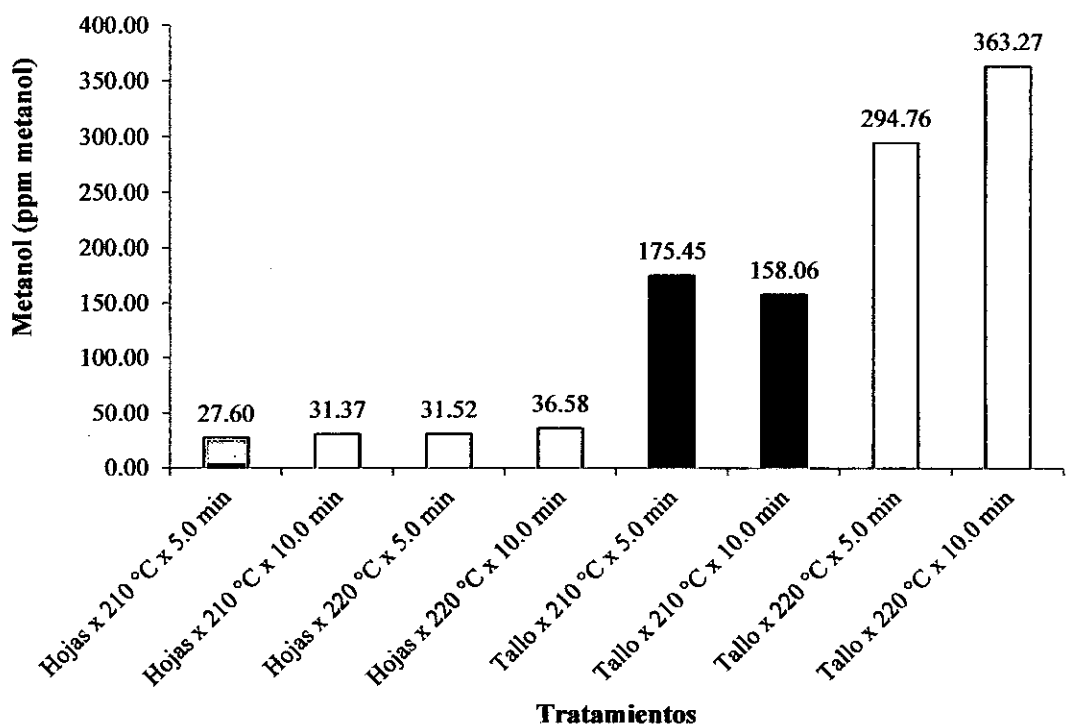


Gráfico 4.32. Efecto de la interacción (Tipo de sustrato x Temperaturas de extracción por vapor (°C) x Tiempo de extracción por vapor (min)), sobre la concentración de metanol (ppm metanol) del etanol obtenido como producto.

4.7. Análisis Económico

En el anexo 3.10. se presenta el análisis económico en el que se visualiza que con el tratamiento, S₂T₁P₁ obtuvo un rendimiento de 640.72 ml Etanol.kg de sustrato⁻¹ que al multiplicarse por el costo de US\$ 5.577/litro se obtuvo el valor bruto.ha⁻¹ US\$ 64319.31 que al ser restado del costo de producción US\$ 36417.36 permitió obtener una utilidad de S/ 27901.96 la que al dividirse entre el costo de producción se obtuvo la relación beneficio/costo de 0.776.

Lo antes indicado es importante resaltar, que de utilizar le residuo biomasa generado en la industria del etanol, se puede obtener beneficios económicos y productos limpios que a la vez contribuyen en disminuir la contaminación ambiental.

CONCLUSIONES

- ✓ El nivel de producción de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica Sorgo Dulce (*Sorghum bicolor* Var. Sugar Drip), para hojas fluctúa entre 136.73 a 408.88 ml Etanol.kg de sustrato⁻¹, y para tallo de 146.68 a 640.72ml Etanol.kg de sustrato⁻¹
- ✓ El análisis físico químico de la biomasa lignocelulósica del cultivo de Sorgo Dulce para tallo fue: Humedad 72.31%, Grasa total 0.37%, Cenizas 8.59%, Materia Orgánica 91.41%, Nitrógeno total 1.45%, Fosforo 0.15%, Celulosa 41.78%, Hemicelulosa 26.28% y Lignina 31.02%. Y para hoja fue: Humedad 44.42%, Grasa total 3.33%, Cenizas 10.33%, Materia Orgánica 89.67%, Nitrógeno total 1.71%, Fosforo 0.92%, Celulosa 36.35%, Hemicelulosa 21.44% y Lignina 27.99%
- ✓ La operación de fermentación se desarrolló con valores de concentración de solidos solubles entre 0.13 y 5.45 °brix, para el pH valores entre 3.47 y 5.45, acidez total 1.240 - 2.286 % ác. Sulfúrico; y a temperaturas de ambiente.
- ✓ La máxima concentración de etanol en la fermentación y mayor rendimiento de producción bioetanol respecto al sustrato consumido la obtuvo el tratamiento S₂T₁P₁ con 16.09 % p.v⁻¹ y 640.72 ml de etanol/kg de sustrato.
- ✓ El nivel de producción de impurezas varía desde 486.44 ppm de impurezas obtenida por el tratamiento Hojas x 210 °C x 5.0min, hasta 922.49 ppm de impurezas alcanzada por el tratamiento Tallo x 210 °C x 5.0 min.
- ✓ En el análisis de calidad realizado al bioetanol obtenido a partir de biomasa lignocelulósica de Sorgo Dulce (*Sorghum bicolor* Var. Sugar Drip), producido por extracción con vapor según los tratamientos evaluados cumplen con los rangos establecidos por INDECOPI en la Norma Técnica Peruana N° 321.126.2011, para etanol anhidro no desnaturalizado. Destacando los tratamiento Tallo x 210 °C x 5.0 min y Hojas x 210 °C x 5.0 min al obtener mejores resultados.

RECOMENDACIONES

- ✓ Realizar estudios en otros tipos de biomasa lignocelulósica especialmente de plantas C4.
- ✓ Realizar estudios de adaptación o mutación de la bacteria *Zymomonas mobilis* enfocados en aumentar la producción de bioetanol.
- ✓ Analizar los parámetros de separación del bioetanol.
- ✓ Investigar los niveles de nutrientes necesarios para mejorar la fermentación.
- ✓ Evaluar la influencia del uso de biorreactores agitados en la etapa de fermentación de biomasa lignocelulósica.

BIBLIOGRAFÍA

- **A.O.A.C. Official Methods of Analysis (1995).** Association of Official Analytical Chemists. Washington DC, EEUU.
- **Adanaqué T. (2009).** Extracción y Caracterización de Alcohol a Partir de Sorgo Dulce (*Sorghum bicolor* Var. Sugardrip). Tesis Ingeniero Agroindustrial e Industrial Alimentarias. UNP. (3 -53 pp.)
- **Alfani A., Gallifuoco F., Saporosi A., Spera A., Cantarella M. (2000).** Comparison of SHF and SSF process for the bioconversion of steam-exploded wheat straw. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 25, 184-192.
- **Alfaro A y col (2009).** Bioresource Technology. Pag. 100, 440
- **Almeida JRM y col. (2007).** Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Chem Techno Biotechnology* 82:340–349.
- **American National Standard Institute (ASTM). (1974).** Standard Method of Test for Lignin in Wood. Designation D 1103-60. American National Standard 013.5-1960: 342, 343.
- **American National Standard Institute (ASTM).(1974).** Standard Method of Test for Lignin in Wood. Designation D 1106-56. American National Standard 013.5-1960: 342, 343.
- **AOAC. 920.151 (2005).** Official Methods of Analysis, 15th Ed., (W. Horwitz, Ed.) Association of official Analytical Chemists, Washington, DC.
- **AOAC. 940.26. (2005).** Official Methods of Analysis, 15th Ed., (W. Horwitz, Ed.) Association of Official Analytical Chemist, Washington, DC.
- **AOAC. 947.05. (2005).** Official Methods of Analysis, 15th Ed., (W. Horwitz, Ed.) Association of official Analytical Chemists, Washington, DC.
- **AOAC. 960.39. (2005).**Official Methods of Analysis 15th Edition, (W. Horwitz, Ed.) Association of Official Analytical Chemist, Washington, DC.
- **AOAC. 965.17 (2005).** Official Methods of Analysis, 15th Edition, (W. Horwitz, Ed.) Association of Official Analytical Chemist, Washington, DC.
- **AOAC. 973.41 (2005).** Official Methods of Analysis, 15th Edition, (W. Horwitz, Ed.) Association of Official Analytical Chemist, Washington, DC.

- **AOAC. 973.43 (2005).** Official Methods of Analysis, 15th Edition, (W. Horwitz, Ed.) Association of Official Analytical Chemist, Washington, DC.
- **AOAC. 981.10 (2005).** Official Methods of Analysis, 15th Edition, (W. Horwitz, Ed.) Association of Official Analytical Chemist, Washington, DC.
- **AOAC. 981.12 (2005).** Official Methods of Analysis, 15th Edition, (W. Horwitz, Ed.) Association of Official Analytical Chemist, Washington, DC.
- **Ballesteros M. (2006).** Carburantes sin petróleo: Bioetanol. *Investigación y Ciencia* Pág. 78-85.
- **Ballesteros et. al. (2002).** Simultane ou ssaccharification and fermentation process for converting the cellulosic fraction of oliveoil extraction residue into ethanol. *Grasasy Aceites* Pág. 282-288.
- **Bourgeois C.M. y Larpent J. P. (1995).** Microbiología Alimentaria. Vol. II. Fermentaciones Alimentarias. Edi. Acribia S.A. Zaragoza. España. Pág. 125-132.
- **Brook, T. (1993).** Microbiología. Editorial Prentice Hall Hispanoamericana S.A. México Englewood (pp. 46).
- **Cara C. y col (2006).** Enhanced enzymatic hydrolysis of olivetree wood by steam explosion and alkaline peroxide de lignification. *Process Biochemistry* Pág. 423-429.
- **CardonaC. A. y Sánchez O. J.(2007).** Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities. *Bioresource Technology*, Pág. 2415-2457.
- **Chopey, N (1986).** Cálculos Matemático para Ingeniería Química. Primera Edición Editorial Mc Graw – Hill (pp. 71-82)
- **Chu B. C. H. y Lee H. (2007).** Genetic improvement of *Saccharomyces cerevisiae* for xylose fermentation. *Biotechnology Advances* Pág. 425-441.
- **Delneri D., Gardner D. C. J., Bruschi C. V. & Oliver S. G. (1999).** Disruption of seven hypothetical aryl-alcohol dehydrogenase genes from *Saccharomyces cerevisiae* and construction of a multiple knock-out strain. *Yeast* 15: 1681-1689.
- **Demirbas A. (2008).** *Biodiesel A Realistic Fuel Alternative for Diesel Engines*, 1ª. Edición, Springer – Verlag London Limited. Pág. 3,
- **FAO (2004).** Revista Agrícola. 18 pp.
- **Galbe, M., y Zacchi, G. (2002).** A review of the production of ethanol from softwood. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59, 618- 628.
- **Galbe M. Zacchi G. (2002).** Areview of the production of ethanol from soft wood. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Pág. 609-617.
- **García, Mariano y otros (1993).** Biotecnología de alimentos. Limusa Noriega Editores. México. Pág. 263-311.

- **García, O. A. M; Ponce, R. E. (2003).** Metabolismo del carbono en microorganismos de interés biomédico y biotecnológico: Vía de Entner-Doudoroff. *Biotecnología Aplicada*. 20, 85-94.
- **Geankoplis Christie J. (1998).** Procesos De Transporte Y Operaciones Unitarias. Compañía Editorial Continental S.A .México. (493- 482 pp.).
- **Hahn-Hägerdal B. (1994).** Ethanolic fermentation of lignocellulosic hydrolysates. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 57/58: 195-199.
- **Hamacher T, Becker J, Gardonyi M.,Boles E. (2002).** Characterization of the xylose-transporting properties of yeast hexose transporters and their influence on xylose utilization. *Microbiology* Pág. 2783-2788.
- **Hendriks A. T. W. M. y Zeeman G.(2009).**Pretreatments to enhance the digestibilityof lignocellulosic biomass.*Bioresource Technology*. Pág. 10-18.
- **Hengstebeck, R (1964).** Destilación, principios y métodos de diseño. Primera edición. Limusa grupo noriega editores. México (pp. 15, 20, 21,44-46).
- **Holland, Ch. (1992).** Fundamentos de Destilación de Mezclas Multicomponentes. Primera Edición. Limusa Grupo Noriega. México. Pág. 15, 20, 21,44-46 pp.
- **Hon, D.N.S. y Shiraishi, N. (2001).** Wood and Cellulosic Chemistry, second ed.
- **INDECOPI. NTP 210.021.2003.** Norma Técnica Peruana para Caracterizar Bebidas Alcohólicas. Método para determinar alcoholes superiores.
- **INDECOPI. NTP 210.022.2003.** Norma Técnica Peruana para Caracterizar Bebidas Alcohólicas. Método para Determinar el contenido de metanol.
- **INDECOPI. NTP 211.003.2003.** Norma Técnica Peruana para Caracterizar Bebidas Alcohólicas. Método para determinas ésteres totales.
- **INDECOPI. NTP 211.035.2008.** Norma Técnica Peruana para Caracterizar Bebidas Alcohólicas. Método para determinar metanol y congéneres en bebidas alcohólicas y en alcohol etílico empleado en su elaboración, mediante cromatografía de gases.
- **INDECOPI. NTP 211.038.2003.** Norma Técnica Peruana para Caracterizar Bebidas Alcohólicas. Método para determinar aldehídos.
- **INDECOPI. NTP 221.040.2003.** Norma Técnica Peruana para Caracterizar Bebidas Alcohólicas. Método para determinar acidez total.
- **Jönsson L. J., Palmqvist E., Nilvebrant N. O., & Hahn-Hägerdal B. (1998).** Detoxification of wood hydrolysates with laccase and peroxidase from white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49: 691-697.

- **Jorgensen, H., Kristensen, J.B Felby C. (2007).** Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 1, 119-134.
- **Klinke H. B., Ahring B. K., Schmidt A. S., Thomsen A. B. (2002).**Characterization of degradation products from alkaline wet oxidation of wheatstraw. *Bioresource Technology*. Pág. 15-26.
- **Krestzschmar, G. (1961).** Alcoholes y Levaduras. Editorial Continental. EEUU. (58-61 pp.).
- **Kristensen J. B., Thygesen L. G., Felby C., Jorgensen H., Elder T. (2008).**Cell-wall structural changes in wheats traw pretreated for bioethanol production.*Biotechnology for Biofuels*. Pág. 5.
- **Larsson S., Quintana S., Reimann A., Nilvebrant N.O., Jonsson, L.J. (2000).** Influence of lignocellulose-derived aromatic compounds on oxygen-limited growth and ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 84-86, 617-632.
- **Lynd L. R., Weimer P. J., VanZ y IW.H., Pretoriusl. S.(2002).**Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. Pág. 506-577.
- **Manual de Análisis de Alimentos. (1984).** Tecnología de Alimentos. UNALM. Lima - Perú
- **Montgomery, D. (2002).** Diseño y Análisis de Experimentos. Segunda Edición Editorial Limusa S.A. México.
- **Morrison, L (1990).** Química Orgánica. Quinta Edición. Editorial Addison – Wesley Iberoamericana. Wilmington. USA
- **Mosier N., Wyman C. E., Dale B. D., Elander R. T., Lee Y. Y., Holtzapple M.,Ladisch C.M.(2005).**Features of promising technologies for pretreatmentof lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*. Pág. 673-686.
- **Öhgren, K., Bengtsson O., Gorwa-Grauslund M.F., Galbe M., Hahn-Hägerdal, B.,Zacchi G. (2006b).** Simultaneous saccharification and co-fermentation of glucose and xylose in steam-pretreated corn stover at high fiber content with *Saccharomyces cerevisiae* TMB3400. *Journal of Biotechnology* 126, 488-498.
- **Oliva J. M., Sáez F., Ballesteros I., González A.,Negro M.J., Ballesteros,M.(2003).**Effecto flignocellulosic degradation compounds fromsteam explosionpretreatmentonethanolfermentationbythermotolerantyeast*Kluyveromycesma rxianus*.*Applied Biochemistry and Biotechnology*. Pág. 141-154.
- **OlssonL., Sorensen H. R., Dam B. P.,Krogh K. M., Meyer A. S.(2006).**Separate and

simultaneous enzymatic hydrolysis and fermentation of wheat hemicellulose with recombinant xylose utilizing *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Pág. 129-132, 117-129.

- **Palmqvist E., Hagerdal B. (2000).** Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology*. 74(1): 25-33.
- **Palonen, H. (2004).** Role of lignin in enzymatic hydrolysis of lignocellulose. Tesis Doctoral. <http://lib.tkk.fi/Diss/2004/isbn9513862720/isbn9513862720.pdf>
- **Pereira, Xavier Isidro. Albarracín, Jonathan Diego. (2010).** Evaluación del proceso de producción de bioetanol de segunda generación a partir de residuos lignocelulósicos utilizando metodologías de análisis energético e integración de procesos. Bucaramanga, Trabajo de grado, Universidad Industrial de Santander. Facultad de fisicoquímica.
- **Pérez, J. A., González A., Oliva J.M., Ballesteros I., (2007).** Effect of process variables on liquid hot water pretreatment of wheat straw for bioconversion to fuel ethanol in a batch reactor. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. Pág. 82
- **Prescott, S. Gordon C. (1962).** Microbiología Industrial. Tercera Edición. Editorial Aguilar. Madrid España (pp. 997-102, 137-150)
- **Quesada J., Villalón M., López H. Y López M. (1996).** Manual de Prácticas de Fermentaciones Industriales. Departamento de Nutrición y Bromatología. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada. España.
- **Rankine, B. (1995).** Making Good Wine. Editorial Pan Macmillan. Australia.
- **Saha B.C. (2003).** Hemicellulose bioconversion. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 30, 279-291.
- **Sánchez O.J. y Cardona C.A. (2008).** Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feed stock. *Bioresource Technology*. Pág. 155.
- **Sprenger, G. A. (1996).** Carbohydrate metabolism in *Zymomonas mobilis*: a catabolic highway with some scenic routes. *FEMS Microbiology Letters*, v. 145, p. 301-307.
- **Sun Y. y Cheng J. Y. (2002).** Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: are views. *Bioresource Technology*. Pág. 1-11.
- **Swings, J; De Ley, J. (1977).** The Biology of *Zymomonas*. *Bacteriological Reviews*. 41 (1), 1-46.

- **Villanueva, W (1997).** IV Seminario de Procesos Químicos Industriales y su Control de Calidad: Elaboración de Alcohol Etilico. Complejo Agroindustrial Cartavio S.A. planta de alcohol. Trujillo.
- **Walkley A, Black A (1934).** An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter, and proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil ci.* 37:29-38.
- **Ward, O (1989).** Biotecnología de la Fermentación: Principios, Procesos y Productos. Primera edición. Editorial Acribia S.A. Zaragoza España (pp1, 82,134).
- **Wyman C. E., Dale B. E., Elander R. T.,Holtzapple M., Ladisch M. R.,Lee Y. Y.(2005).** Coordinated development fleading biomass pretreatmentte chnologies. *Bioresource Technology.* Pág. 1959-1966.
- **Xiao Z., Zhang X.,Greff D. J.,Saddler J. N. (2004).**Effects of sugar inhibition on cellulases and β -glucosidase during enzymatic hydrolysis of softwood substrates. *Applied Biochemistry and Biotechnology.* Pág. **113-116.**

Referencias web

- **MINAG (2013).** En el boletín de Biocombustibles y Marco Tributario. Dirección General de Información Agraria, recuperado de: www.minag.gob.pe
- **Proyecto etanol,** del boletín de Ingeniería Civil y medio ambiente, recuperado de: <http://www.miliarium.com/bibliografia/Monografias/Biocombustibles/Bioetanol.asp>

ANEXOS

ANEXO I. Análisis de biomasa lignocelulósica del cultivo de Sorgo Dulce

ANEXO 1.1. Análisis físico – químico de la biomasa lignocelulósica del cultivo de Sorgo Dulce.

Determinación	TALLO (%)					HOJA (%)				
	M1	M2	M3	M4	Promedio	M1	M2	M3	M4	Promedio
Humedad	72.58	70.36	73.46	72.85	72.31	44.65	45.98	41.67	45.38	44.42
Grasa	0.37	0.40	0.38	0.34	0.37	0.79	0.63	0.58	0.46	0.62
Cenizas	8.02	8.46	9.95	7.92	8.59	10.26	10.95	10.17	9.93	10.33
Materia orgánica	91.98	91.54	90.05	92.08	91.41	89.74	89.05	89.83	90.07	89.67
Nitrógeno total	1.57	1.33	1.65	1.24	1.45	1.91	1.85	1.66	1.43	1.71
Fósforo disponible	0.19	0.12	0.13	0.16	0.15	1.13	0.95	0.72	0.88	0.92
Celulosa	40.72	43.17	41.20	42.03	41.78	34.12	39.84	35.15	36.29	36.35
Hemicelulosa	28.45	24.13	26.66	25.88	26.28	22.81	20.95	21.87	20.14	21.44
Lignina	30.91	32.44	31.51	29.23	31.02	27.14	29.28	28.27	27.28	27.99

Fuente: Elaboración propia.

ANEXO II. Análisis de fermentación de biomasa lignocelulósica del cultivo de Sorgo Dulce.

ANEXO 2.1. Datos de variación de sólidos solubles (°Brix) en la etapa de fermentación.

Día	Hojas x 210°C x 5 min					Hojas x 210°C x 10 min					Hojas x 220°C x 5 min					Hojas x 220°C x 10 min				
	1	2	3	4	Prom.	1	2	3	4	Prom.	1	2	3	4	Prom.	1	2	3	4	Prom.
0	4.90	4.70	5.00	4.60	4.80	4.80	5.00	4.70	4.60	4.78	5.00	4.90	4.90	4.70	4.88	5.00	4.90	5.00	4.70	4.90
1	4.80	4.50	4.90	4.40	4.65	4.80	4.70	4.60	4.60	4.68	5.00	4.90	4.80	4.50	4.80	4.70	4.80	4.70	4.60	4.70
2	4.20	4.00	4.00	3.90	4.03	4.00	3.90	4.10	4.40	4.10	4.50	4.30	4.10	4.00	4.23	4.20	4.30	4.20	4.20	4.23
3	3.60	3.40	3.50	3.50	3.50	3.40	3.00	3.50	3.60	3.38	3.80	3.40	3.70	3.20	3.53	3.70	3.70	3.50	3.60	3.63
4	2.50	3.40	3.00	2.80	2.93	3.20	2.90	2.70	3.00	2.95	3.10	3.10	3.10	3.00	3.08	3.10	2.80	2.60	2.40	2.73
5	2.00	2.80	2.30	2.20	2.33	2.60	2.20	2.00	2.50	2.33	2.40	2.50	2.40	2.50	2.45	2.50	2.30	2.00	1.80	2.15
6	0.70	1.50	1.00	1.50	1.18	1.80	1.20	0.50	0.90	1.10	1.00	1.90	1.20	1.50	1.40	1.60	1.60	1.40	0.50	1.28
7	0.34	0.00	0.15	0.40	0.22	0.40	0.25	0.10	0.30	0.26	0.20	0.30	0.00	0.00	0.13	0.40	0.40	0.50	0.20	0.38

Día	Tallo x 210°C x 5 min					Tallo x 210°C x 10 min					Tallo x 220°C x 5 min					Tallo x 220°C x 10 min				
	1	2	3	4	Prom.	1	2	3	4	Prom.	1	2	3	4	Prom.	1	2	3	4	Prom.
0	5.20	4.90	5.10	5.40	5.15	5.00	5.20	5.50	5.00	5.18	5.40	5.60	5.30	5.50	5.45	5.00	5.20	4.90	5.30	5.10
1	5.10	4.70	4.80	5.10	4.93	4.90	5.00	5.30	5.00	5.05	5.10	5.40	4.90	5.30	5.18	4.80	5.00	4.70	5.00	4.88
2	4.70	4.20	4.20	4.50	4.40	4.10	4.40	4.60	4.20	4.33	4.50	4.50	4.10	4.60	4.43	4.10	4.30	4.20	4.80	4.35
3	4.00	3.60	4.00	4.10	3.93	3.60	3.90	4.00	3.60	3.78	4.10	4.00	3.70	4.00	3.95	3.30	3.70	3.70	4.00	3.68
4	3.50	3.10	3.00	3.20	3.20	3.30	3.50	3.20	3.50	3.38	3.30	3.40	3.50	3.68	3.47	3.10	3.40	3.00	3.00	3.13
5	2.80	2.70	2.40	2.50	2.60	2.50	2.90	2.60	2.60	2.65	2.75	2.80	3.00	3.13	2.92	2.50	2.50	2.40	2.30	2.43
6	1.40	1.70	1.60	1.80	1.63	1.00	2.10	1.60	1.60	1.58	1.55	2.00	2.40	2.43	2.09	1.00	1.30	1.00	1.50	1.20
7	0.60	0.60	0.40	0.30	0.48	0.00	1.10	0.20	0.30	0.40	0.60	0.50	0.80	1.20	0.78	0.40	0.45	0.60	0.40	0.46

ANEXO 2.2. Datos de variación de pH en la etapa de fermentación.

Hojas x 20°C x 5 min						Hojas x 20°C x 10 min						Hojas x 22°C x 5 min						Hojas x 22°C x 10 min					
Día	1	2	3	4	Prom.	1	2	3	4	Prom.	1	2	3	4	Prom.	1	2	3	4	Prom.			
0	4.84	4.98	5.13	4.87	4.93	4.51	4.66	4.73	4.84	4.69	4.91	4.94	4.94	5.11	4.98	4.97	4.92	5.00	5.02	4.98			
1	4.66	4.77	4.88	4.76	4.77	4.42	4.39	4.55	4.80	4.57	4.78	4.73	4.67	4.63	4.70	4.90	4.91	4.98	4.96	4.94			
2	4.43	4.34	4.46	4.44	4.42	4.27	4.18	4.32	3.42	4.05	4.36	4.41	4.32	4.28	4.34	4.85	4.88	4.95	4.90	4.90			
3	4.21	4.20	4.20	4.27	4.22	3.80	3.99	4.18	4.17	4.04	4.03	4.02	4.10	4.06	4.05	4.71	4.81	4.87	4.84	4.81			
4	3.85	3.82	3.69	4.77	4.03	3.73	3.87	3.91	3.96	3.87	3.92	3.89	3.96	3.94	3.93	4.62	4.62	4.59	4.62	4.61			
5	3.82	3.70	3.73	3.67	3.73	3.65	3.73	3.81	3.83	3.76	3.81	3.86	3.86	3.86	3.85	4.33	4.22	4.19	4.22	4.24			
6	3.65	3.63	3.65	3.64	3.64	3.56	3.65	3.76	3.72	3.67	3.75	3.86	3.75	3.82	3.80	3.87	3.88	3.80	3.89	3.86			
7	3.38	3.53	3.44	3.52	3.47	3.56	3.62	3.48	3.62	3.57	3.71	3.64	3.74	3.80	3.72	3.75	3.87	3.70	3.87	3.80			

Tallo x 20°C x 5 min						Tallo x 20°C x 10 min						Tallo x 22°C x 5 min						Tallo x 22°C x 10 min					
Día	1	2	3	4	Prom.	1	2	3	4	Prom.	1	2	3	4	Prom.	1	2	3	4	Prom.			
0	5.14	5.22	5.29	5.33	5.25	5.33	5.21	5.32	5.41	5.32	5.33	5.24	5.33	5.41	5.33	5.41	5.44	5.44	5.51	5.45			
1	5.21	5.24	5.22	5.29	5.24	5.31	5.21	5.32	5.41	5.31	5.33	5.02	5.29	5.26	5.23	5.37	5.15	5.22	5.37	5.28			
2	4.81	4.85	4.81	5.15	4.91	5.13	5.31	5.24	5.37	5.26	5.02	4.82	5.23	5.01	5.07	4.79	4.61	5.16	4.76	4.83			
3	4.67	4.81	4.80	5.18	4.87	5.21	5.26	5.21	5.19	5.22	4.76	4.37	4.80	4.56	4.62	4.25	4.86	4.73	4.46	4.58			
4	4.85	4.77	4.76	3.83	4.55	5.15	5.22	5.29	5.17	5.21	4.31	4.05	4.73	4.17	4.32	4.14	4.25	4.28	4.23	4.23			
5	3.55	3.70	3.82	3.69	3.69	4.72	4.83	4.78	5.19	4.88	3.82	3.95	4.11	4.00	3.97	4.13	4.09	4.13	4.12	4.12			
6	3.52	3.64	3.60	3.60	3.59	4.84	4.77	4.74	3.68	4.51	3.80	3.94	4.09	3.98	3.95	4.10	4.04	4.00	4.04	4.04			
7	3.52	3.64	3.49	3.58	3.56	3.81	3.61	3.62	3.64	3.67	3.79	3.90	3.89	3.97	3.89	4.09	3.99	3.01	3.97	3.77			

ANEXO 2.3. Datos de variación de acidez (% ác. sulfúrico) en la etapa de fermentación.

Hojas x 20°C x 5 min						Hojas x 20°C x 10 min						
Día	1	2	3	4	Prom.	Ac.	1	2	3	4	Prom.	Ac.
0	0.982	0.972	0.951	1.020	0.981	0.962	1.212	1.374	1.272	1.095	1.298	1.213
1	0.994	0.954	0.996	1.032	0.994	0.974	1.737	1.310	1.272	1.589	1.477	1.448
2	1.365	1.412	1.439	1.386	1.401	1.373	2.033	1.845	1.814	1.916	1.904	1.865
3	1.412	1.470	1.465	1.452	1.450	1.421	1.768	2.024	1.985	1.883	1.915	1.877
4	1.543	1.501	1.498	1.469	1.503	1.473	2.542	2.432	2.667	2.357	2.499	2.440
5	1.447	1.477	1.490	1.485	1.475	1.445	1.936	2.185	2.212	1.989	2.083	2.041
6	1.453	1.581	1.389	1.530	1.483	1.454	2.628	2.572	2.717	2.648	2.641	2.588
7	1.433	1.623	1.453	1.571	1.520	1.490	2.028	2.339	2.501	1.930	2.225	2.180
Hojas x 22°C x 5 min						Hojas x 22°C x 10 min						
Día	1	2	3	4	Prom.	Ac.	1	2	3	4	Prom.	Ac.
0	1.268	1.306	1.216	1.271	1.265	1.240	1.069	1.087	1.257	1.201	1.154	1.131
1	1.374	1.955	1.382	1.283	1.499	1.469	1.386	1.572	1.262	1.237	1.364	1.337
2	2.028	2.003	2.082	2.188	2.074	2.032	1.977	1.935	2.020	1.991	2.006	1.966
3	2.658	1.902	1.959	2.222	2.060	2.019	1.731	1.850	2.180	2.065	1.957	1.918
4	2.375	2.151	2.255	2.266	2.262	2.217	1.814	2.398	2.417	1.969	2.150	2.107
5	2.612	2.316	2.688	2.751	2.580	2.529	1.613	1.928	2.709	2.116	2.089	2.047
6	2.836	2.164	2.153	2.090	2.111	2.068	1.770	2.645	2.886	2.278	2.195	2.151
7	2.050	2.021	2.028	2.086	2.046	2.005	1.819	1.981	2.090	1.975	1.956	1.927
Tallo x 20°C x 5 min						Tallo x 20°C x 10 min						
Día	1	2	3	4	Prom.	Ac.	1	2	3	4	Prom.	Ac.
0	1.277	1.191	1.165	1.139	1.193	1.169	1.171	1.366	1.341	1.071	1.237	1.212
1	1.689	1.557	1.528	1.164	1.479	1.450	1.368	1.619	1.646	1.240	1.466	1.437
2	2.120	1.950	1.975	1.925	1.992	1.953	2.031	1.789	1.816	1.948	1.896	1.858
3	2.164	2.055	2.100	1.982	2.078	2.036	1.993	1.816	1.913	2.015	1.934	1.896
4	2.045	1.843	1.940	2.046	1.969	1.929	2.532	2.401	2.319	2.359	2.403	2.355
5	2.804	2.084	2.175	2.173	2.309	2.263	2.100	2.002	2.201	2.177	2.173	2.080
6	2.030	2.309	2.162	2.194	2.174	2.130	2.652	2.497	2.657	2.742	2.637	2.584
7	2.075	1.957	1.935	1.929	1.974	1.934	2.223	2.410	2.659	2.638	2.333	2.286
Tallo x 22°C x 5 min						Tallo x 22°C x 10 min						
Día	1	2	3	4	Prom.	Ac.	1	2	3	4	Prom.	Ac.
0	1.273	1.265	1.230	1.241	1.254	1.229	1.009	1.106	1.284	1.189	1.147	1.124
1	1.774	1.897	1.329	1.554	1.638	1.616	1.380	1.589	1.637	1.266	1.468	1.438
2	2.075	2.043	2.076	2.166	2.090	2.048	1.923	1.916	2.131	2.015	1.994	1.954
3	2.015	1.931	2.052	2.065	2.016	1.975	1.782	1.864	2.107	1.978	1.910	1.872
4	2.210	2.260	2.278	2.286	2.258	2.213	1.630	2.347	2.299	2.058	2.128	2.086
5	2.714	2.583	2.540	2.680	2.604	2.552	1.714	1.968	2.384	2.000	2.017	1.976
6	2.054	2.080	2.120	2.055	2.077	2.036	1.768	2.629	2.041	2.316	2.188	2.145
7	2.186	2.164	2.063	2.127	2.135	2.132	1.810	1.986	2.069	2.035	1.973	1.933

ANEXO 2.4. Rendimiento físico (l.ha⁻¹)

Tratamientos		Sustrato	Mezcla (sustrato, inoculo y agua)	Fermentación		Destilación		Rectificación		Deshidratación		ml Etanol.kg de sustrato ⁻¹	Porcentajes (%)		Rendimiento por Hectárea			
				Jugo (l)	sustrato (kg)	Alcohol (l)	Vinaza (l)	Alcohol Rect. (l)	Vinaza (l)	Etanol (l)	Vinaza (l)		Residuos	Etanol	Jugo (L)	Bagazo (Kg)	Etanol (L)	
70l	Hojas	5.0 min	1.5	15.00	14.13	0.87	3.567	10.56	1.78	1.78	1.425	0.36	380.12	90.50	9.50	314.15	18.00	2.04
					14.08	0.92	3.850	10.23	1.92	1.93	1.533	0.38	408.88	89.78	10.22	344.37	18.00	2.19
					14.07	0.93	3.699	10.37	1.85	1.85	1.477	0.37	393.96	90.15	9.85	325.86	18.00	2.11
					14.03	0.97	3.843	10.19	1.92	1.93	1.532	0.38	408.55	89.79	10.21	344.05	18.00	2.19
		10 min	1.5	15.00	14.15	0.85	3.412	10.74	1.70	1.71	1.380	0.32	367.90	90.80	9.20	309.85	18.00	1.97
					14.20	0.80	3.526	10.67	1.75	1.77	1.419	0.33	378.29	90.54	9.46	317.62	18.00	2.03
					14.18	0.82	3.514	10.67	1.75	1.76	1.417	0.33	377.79	90.56	9.44	316.76	18.00	2.02
					14.07	0.93	3.334	10.74	1.66	1.67	1.345	0.32	358.62	91.03	8.97	301.61	18.00	1.92
	Tallo	5.0 min	1.5	15.00	14.26	0.74	5.796	8.46	2.88	2.92	2.299	0.58	612.99	84.68	15.32	516.13	33.00	6.02
					14.33	0.67	6.042	8.29	3.01	3.03	2.403	0.60	640.72	83.98	16.02	537.36	33.00	6.29
					14.40	0.60	5.724	8.68	2.83	2.89	2.262	0.57	603.26	84.92	15.08	498.98	33.00	5.92
					14.37	0.63	5.690	8.68	2.83	2.86	2.263	0.57	603.54	84.91	15.09	499.83	33.00	5.93
		10 min	1.5	15.00	14.13	0.87	4.012	10.12	1.99	2.02	1.568	0.42	418.25	89.54	10.46	356.21	33.00	4.11
					14.09	0.91	3.995	10.09	1.98	2.02	1.563	0.42	416.69	89.58	10.42	355.40	33.00	4.09
					14.22	0.78	3.903	10.32	1.95	1.96	1.534	0.41	409.16	89.77	10.23	349.81	33.00	4.02
					14.27	0.73	3.880	10.39	1.93	1.95	1.523	0.41	362.53	89.85	10.15	308.18	33.00	3.99
220 °C	Hojas	5.0 min	1.5	15.00	14.02	0.98	4.81	9.21	2.38	2.43	1.091	1.29	290.94	92.73	7.27	244.97	18.00	1.56
					13.88	1.12	4.34	9.54	2.16	2.19	1.073	1.08	286.26	92.84	7.16	240.08	18.00	1.53
					13.92	1.08	4.56	9.36	2.26	2.30	0.979	1.28	260.99	93.48	6.52	215.87	18.00	1.40
					14.10	0.90	4.58	9.52	2.28	2.30	1.103	1.18	294.03	92.65	7.35	243.50	18.00	1.58
		10 min	1.5	15.00	13.66	1.34	5.60	8.06	2.76	2.84	0.535	2.23	142.68	96.43	3.57	120.49	18.00	0.76
					13.82	1.18	5.29	8.53	2.64	2.65	0.521	2.12	138.94	96.53	3.47	116.62	18.00	0.74
					13.80	1.20	5.50	8.30	2.72	2.78	0.553	2.17	147.57	96.31	3.69	124.84	18.00	0.79
					13.88	1.12	5.68	8.20	2.84	2.84	0.513	2.32	136.73	96.58	3.42	115.50	18.00	0.73
	Tallo	5.0 min	1.5	15.00	13.87	1.13	7.86	6.01	3.90	3.97	1.262	2.63	336.65	91.58	8.42	282.82	33.00	3.31
					14.04	0.96	7.86	6.18	3.92	3.94	1.369	2.55	365.11	90.87	9.13	304.77	33.00	3.59
					14.03	0.97	7.86	6.17	3.92	3.94	1.265	2.65	337.39	91.57	8.43	280.73	33.00	3.31
					14.09	0.91	8.00	6.09	3.98	4.02	1.383	2.59	368.89	90.78	9.22	310.05	33.00	3.62
		10 min	1.5	15.00	13.80	1.20	8.35	5.45	4.17	4.18	0.683	3.48	182.16	95.45	4.55	153.98	33.00	1.79
					13.66	1.34	8.34	5.32	4.16	4.18	0.660	3.50	175.94	95.60	4.40	147.85	33.00	1.73
					13.89	1.11	8.29	5.59	4.11	4.18	0.644	3.47	171.82	95.70	4.30	144.55	33.00	1.69
					13.82	1.18	8.49	5.33	4.16	4.33	0.550	3.61	146.88	96.33	3.67	124.11	33.00	1.44

ANEXO 2.5. Datos de producción de etanol (%p.v⁻¹) durante el proceso de fermentación.

Hojas x 210°C x 5 min						Hojas x 210°C x 10 min				
Día	1	2	3	4	Prom.	1	2	3	4	Prom.
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
1	0.320	0.180	0.210	0.240	0.238	0.150	0.055	0.750	0.150	0.276
2	2.288	2.364	2.010	2.400	2.266	2.310	3.175	4.110	2.310	2.976
3	5.648	5.244	6.090	7.560	6.136	6.390	6.775	7.230	6.630	6.756
4	8.048	8.556	8.490	9.120	8.554	8.310	8.455	9.150	8.310	8.556
5	9.200	9.732	9.930	10.560	9.856	9.270	9.415	9.750	8.910	9.336
6	9.896	10.332	10.770	10.800	10.450	9.630	9.847	9.990	9.366	9.708
7	10.088	10.500	10.890	10.920	10.600	9.750	9.991	9.990	9.558	9.822

Hojas x 220°C x 5 min						Hojas x 220°C x 10 min				
Día	1	2	3	4	Prom.	1	2	3	4	Prom.
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
1	0.030	0.047	0.030	0.020	0.032	0.053	0.050	0.170	0.190	0.116
2	1.470	1.727	1.950	1.940	1.772	0.725	0.770	0.650	1.390	0.884
3	4.590	4.127	4.590	5.540	4.712	2.045	3.410	1.850	2.470	2.444
4	6.750	5.687	6.030	6.500	6.242	2.957	3.794	3.530	3.046	3.332
5	7.326	6.647	6.990	7.460	7.106	3.389	3.986	3.770	3.430	3.644
6	7.782	7.031	7.422	7.820	7.514	3.893	4.010	3.770	3.670	3.836
7	7.782	7.031	7.734	7.820	7.592	3.917	4.010	3.770	3.694	3.848

Tallo x 210°C x 5 min						Tallo x 210°C x 10 min				
Día	1	2	3	4	Prom.	1	2	3	4	Prom.
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
1	0.280	0.230	0.190	0.270	0.243	0.180	0.230	0.290	0.350	0.263
2	3.400	3.110	3.310	3.150	3.243	1.620	2.150	1.970	2.030	1.943
3	10.360	9.830	11.007	9.870	10.267	6.420	6.950	7.490	7.550	7.103
4	13.960	13.190	14.367	13.710	13.807	10.020	9.110	9.890	9.230	9.563
5	15.160	14.870	16.047	14.910	15.247	10.620	10.070	10.610	10.430	10.433
6	15.880	15.470	16.527	15.510	15.847	10.860	10.550	11.090	10.670	10.793
7	16.120	15.710	16.767	15.750	16.087	11.100	10.790	11.090	10.670	10.913

Tallo x 220°C x 5 min						Tallo x 220°C x 10 min				
Día	1	2	3	4	Prom.	1	2	3	4	Prom.
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
1	0.150	0.450	0.320	0.242	0.291	0.030	0.080	0.030	0.140	0.070
2	2.070	2.130	2.480	1.682	2.091	3.630	2.960	1.230	1.580	2.350
3	6.630	6.690	6.320	5.762	6.351	3.870	3.680	4.350	3.260	3.790
4	8.070	8.034	8.240	7.922	8.067	4.350	4.160	4.590	3.980	4.270
5	8.670	8.994	8.960	9.242	8.967	4.710	4.400	4.830	3.980	4.480
6	9.102	9.018	9.440	9.818	9.345	4.950	4.640	4.830	3.980	4.600
7	9.102	9.018	9.752	9.818	9.423	4.950	4.640	4.830	3.980	4.600

ANEXO 2.6. Datos de taza de producción de etanol (g h.l⁻¹)

Hojas x 210°C x 5 min						Hojas x 210°C x 10 min					Hojas x 220°C x 5 min					Hojas x 220°C x 10 min				
Día	1	2	3	4	Prom.	1	2	3	4	Prom.	1	2	3	4	Prom.	1	2	3	4	Prom.
0-1	0.013	0.008	0.009	0.010	0.005	0.013	0.008	0.004	0.000	0.006	0.000	0.004	0.004	0.013	0.005	0.004	0.000	0.008	0.008	0.005
1a2	0.082	0.091	0.075	0.090	0.025	0.021	0.021	0.021	0.008	0.018	0.025	0.017	0.038	0.033	0.028	0.029	0.021	0.021	0.021	0.023
2a3	0.140	0.120	0.170	0.215	0.024	0.029	0.025	0.025	0.033	0.028	0.038	0.025	0.021	0.038	0.030	0.017	0.029	0.017	0.033	0.024
3a4	0.100	0.138	0.100	0.065	0.019	0.017	0.033	0.029	0.017	0.024	0.025	0.025	0.033	0.025	0.027	0.029	0.038	0.017	0.029	0.028
4a5	0.048	0.049	0.060	0.060	0.025	0.029	0.025	0.021	0.025	0.025	0.025	0.021	0.029	0.025	0.025	0.029	0.029	0.025	0.021	0.026
5a6	0.029	0.025	0.035	0.010	0.040	0.058	0.025	0.042	0.033	0.040	0.029	0.067	0.063	0.054	0.053	0.054	0.042	0.038	0.054	0.047
6a7	0.008	0.007	0.005	0.005	0.057	0.033	0.038	0.063	0.058	0.048	0.046	0.025	0.017	0.013	0.025	0.035	0.040	0.050	0.015	0.035

Hojas x 210°C x 5 min						Hojas x 210°C x 10 min					Hojas x 220°C x 5 min					Hojas x 220°C x 10 min				
Día	1	2	3	4	Prom.	1	2	3	4	Prom.	1	2	3	4	Prom.	1	2	3	4	Prom.
0-1	0.012	0.010	0.008	0.011	0.010	0.008	0.010	0.012	0.015	0.011	0.006	0.019	0.013	0.010	0.012	0.001	0.003	0.001	0.006	0.003
1a2	0.130	0.120	0.130	0.120	0.125	0.060	0.080	0.070	0.070	0.070	0.080	0.070	0.090	0.060	0.075	0.150	0.120	0.050	0.060	0.095
2a3	0.290	0.280	0.321	0.280	0.293	0.200	0.200	0.230	0.230	0.215	0.190	0.190	0.160	0.170	0.178	0.010	0.030	0.130	0.070	0.060
3a4	0.150	0.140	0.140	0.160	0.148	0.150	0.090	0.100	0.070	0.103	0.060	0.056	0.080	0.090	0.072	0.020	0.020	0.010	0.030	0.020
4a5	0.050	0.070	0.070	0.050	0.060	0.025	0.040	0.030	0.050	0.036	0.025	0.040	0.030	0.055	0.037	0.015	0.010	0.010	0.000	0.009
5a6	0.030	0.025	0.020	0.025	0.025	0.010	0.020	0.020	0.010	0.015	0.018	0.001	0.020	0.024	0.016	0.010	0.010	0.000	0.000	0.005
6a7	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.000	0.000	0.005	0.000	0.000	0.013	0.000	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

ANEXO III. Determinaciones de características físico- químicas del bioetanol obtenido a partir de la biomasa lignocelulósica del cultivo de Caña de Azúcar.

ANEXO 3.1. Determinación de la concentración del etanol (°G.L.) obtenido en la etapa de la destilación.

Factor A = Tipo sustrato		Factor B = Temperaturas de extracción por vapor								Tipo sustrato Sum. Prom.	
		210 °C				220 °C					
		Factor C = Tiempo de extracción por vapor				Factor C = Tiempo de extracción por vapor					
		5.0 min		10.0 min		5.0 min		10.0 min			
Hojas	99.97	99.97	99.94	99.64	99.92	99.88	99.98	99.62	1597.49	99.84	
	99.61	99.81	99.96	99.68	99.86	99.89	99.92	99.84			
Tallo	99.54	99.95	99.96	99.93	99.84	99.83	99.78	99.78	1597.65	99.85	
	99.77	99.95	99.84	99.94	99.96	99.94	99.77	99.87			
		398.8									
Sumatoria	9	399.68	399.70	399.19	399.58	399.54	399.45	399.11	3195.14	99.85	
Promedio	99.72	99.92	99.93	99.80	99.90	99.89	99.86	99.78			
Temperaturas de extracción por vapor						210 °C =	1597.46	220 °C =	1597.68		
							99.84		99.86		
Periodos tiempo de extracción por vapor						5.0 min =	1597.69	10.0 min =	1597.45		
							99.86		99.84		

ANEXO 3.2. Determinación de la densidad (g.cm³) del etanol obtenido en la etapa de la destilación.

Factor A = Tipo sustrato		Factor B = Temperaturas de extracción por vapor								Tipo sustrato Sum. Prom.	
		210 °C				220 °C					
		Factor C = Tiempo de extracción por vapor				Factor C = Tiempo de extracción por vapor					
		5.0 min		10.0 min		5.0 min		10.0 min			
Hojas		0.882	0.867	0.867	0.869	0.839	0.844	0.788	0.801	13.519	0.845
		0.877	0.867	0.874	0.853	0.838	0.851	0.804	0.798		
Tallo		0.895	0.905	0.897	0.887	0.867	0.888	0.858	0.862	14.070	0.879
		0.894	0.895	0.888	0.886	0.861	0.874	0.849	0.864		
Sumatoria		3.548	3.534	3.526	3.495	3.405	3.457	3.299	3.325	27.589	0.862
Promedio		0.887	0.884	0.881	0.874	0.851	0.864	0.825	0.831		
Temperaturas de extracción por vapor						210 °C =	14.103	220 °C =	13.486		
							0.881		0.843		
Periodos tiempo de extracción por vapor						5.0 min =	13.944	10.0 min =	13.645		
							0.872		0.853		

ANEXO 3.3. Determinación del pH para el etanol obtenido en la etapa de la destilación.



Factor A = Tipo sustrato	Factor B = Temperaturas de extracción por vapor								Tipo sustrato	
	210 °C				220 °C				Sum.	Prom.
	Factor C = Tiempo de extracción por vapor				Factor C = Tiempo de extracción por vapor					
	5.0 min		10.0 min		5.0 min		10.0 min			
Hojas	7.19	7.18	7.15	7.05	7.02	7.18	7.08	7.22	114.12	7.13
	7.11	7.09	7.14	7.17	7.26	7.13	7.12	7.03		
Tallo	7.00	7.08	7.16	7.17	7.28	7.09	7.18	7.08	106.70	7.11
	7.04	7.05	7.04	7.1.8	7.17	7.12	7.11	7.13		
Sumatoria	28.34	28.40	28.49	21.39	28.73	28.52	28.49	28.46	220.82	7.12
Promedio	7.09	7.10	7.12	7.13	7.18	7.13	7.12	7.12		
Temperaturas de extracción por vapor			210 °C = 106.62 7.11		220 °C = 114.20 7.14					
Periodos tiempo de extracción por vapor			5.0 min = 113.99 7.12		10.0 min = 106.83 7.12					

ANEXO 3.4. Determinación de alcoholes superiores (ppm) obtenidos en la etapa de la destilación.

Factor A = Tipo sustrato	Factor B = Temperaturas de extracción por vapor								Tipo sustrato	
	210 °C				220 °C				Sum.	Prom.
	Factor C = Tiempo de extracción por vapor				Factor C = Tiempo de extracción por vapor					
	5.0 min		10.0 min		5.0 min		10.0 min			
Hojas	161.08	163.13	225.52	207.92	233.25	241.08	301.98	284.57	3627.06	226.69
	168.37	147.37	222.92	211.31	245.29	225.22	295.19	292.86		
Tallo	209.81	194.62	209.17	221.42	265.42	276.67	349.92	328.29	4111.02	256.94
	201.15	222.65	210.98	210.42	269.15	257.02	340.05	344.29		
Sumatoria	740.41	727.76	868.58	851.07	1013.12	1000.00	1287.14	1250.01	7738.08	241.82
Promedio	185.10	181.94	217.15	212.77	253.28	250.00	321.78	312.50		
Temperaturas de extracción por vapor			210 °C =	3187.82	220 °C =			4550.26		
				199.24				284.39		
Periodos tiempo de extracción por vapor			5.0 min =	3481.28	10.0 min =			4256.80		
				217.58				266.05		

ANEXO 3.5. Determinación de aldehídos (ppm Furfural) obtenidos en la etapa de la destilación.

Factor A = Tipo sustrato	Factor B = Temperaturas de extracción por vapor								Tipo sustrato	
	210 °C				220 °C				Sumatoria Promedio	
	Factor C = Tiempo de extracción por vapor				Factor C = Tiempo de extracción por vapor					
	5.0 min		10.0 min		5.0 min		10.0 min			
Hojas	5.98	5.98	6.00	5.93	6.87	6.01	6.07	6.05	96.76	6.05
	5.94	5.97	6.01	5.92	5.98	6.00	6.00	6.06		
Tallo	5.84	5.97	6.07	6.06	6.00	6.02	6.71	5.99	96.90	6.06
	5.92	6.00	6.03	6.06	6.07	6.06	6.04	6.05		
Sumatoria	23.68	23.92	24.11	23.97	24.92	24.09	24.82	24.15	193.66	6.05
Promedio	5.92	5.98	6.03	5.99	6.23	6.02	6.21	6.04		
Temperaturas de extracción por vapor					210°C=	95.67	220 °C =		97.99	
						5.98			6.12	
Periodos tiempo de extracción por vapor					5.0 min =	96.61	10.0 min =		97.05	
						6.04			6.07	

ANEXO 3.6. Datos del Gasto de hidróxido de sodio (mL) en soluciones alcohólicas obtenidas como producto.

Factor A = Tipo sustrato	Factor B = Temperaturas de extracción por vapor							
	210 °C				220 °C			
	Factor C = Tiempo de extracción por vapor				Factor C = Tiempo de extracción por vapor			
	5.0 min		10.0 min		5.0 min		10.0 min	
Hojas	0.71	0.45	0.78	0.92	0.88	0.94	1.00	1.03
	0.65	0.46	0.93	0.88	0.90	0.93	1.04	0.96
Tallo	0.84	0.52	0.82	0.84	0.90	0.95	1.06	1.07
	0.63	0.60	0.73	0.80	0.89	0.93	1.10	1.05

ANEXO 3.7. Datos de la Acidez Total (mg Ácido Acético /L Alcohol Anhidro) del etanol obtenido como producto.



Factor A = Tipo sustrato	Factor B = Temperaturas de extracción por vapor								Tipo sustrato	
	210 °C				220 °C					
	Factor C = Tiempo de extracción por vapor				Factor C = Tiempo de extracción por vapor				Sum.	Prom.
	5.0 min		10.0 min		5.0 min		10.0 min			
Hojas	42.613	27.008	46.828	55.399	52.842	56.468	60.012	62.036	808.88	50.56
	39.153	27.653	55.822	52.970	54.076	55.861	62.450	57.692		
Tallo	50.633	31.216	49.220	50.435	54.087	57.097	63.740	64.342	825.06	51.57
	37.887	36.018	43.870	48.029	53.421	55.834	66.152	63.082		
Sumatoria	170.29	121.89	195.74	206.83	214.43	225.26	252.35	247.15	1633.94	51.06
Promedio	42.57	30.47	48.94	51.71	53.61	56.31	63.09	61.79		
Temperaturas de extracción por vapor			210 °C = 694.75 43.42		220 °C = 939.19 58.70					
Periodos tiempo de extracción por vapor			5.0 min = 731.87 45.74		10.0 min = 902.08 56.38					

ANEXO 3.8. Determinación de esteres (ppm Acetato de etilo) obtenidos en la etapa de la destilación.

Factor A = Tipo sustrato	Factor B = Temperaturas de extracción por vapor								Tipo sustrato		
	210 °C				220 °C				Sum.	Prom.	
	Factor C = Tiempo de extracción por vapor				Factor C = Tiempo de extracción por vapor						
	5.0 min		10.0 min		5.0 min		10.0 min				
Hojas	249.21	272.99	272.60	268.18	307.31	272.05	308.37	300.53	4512.73	282.05	
	257.82	271.49	272.95	267.85	271.74	307.06	307.20	305.37			
Tallo	243.43	260.56	260.81	260.08	305.46	275.59	339.62	309.82	4492.91	280.81	
	246.79	249.94	258.82	272.55	307.99	273.45	318.35	309.65			
Sumatoria	997.25	1054.98	1065.17	1068.66	1192.52	1128.15	1273.54	1225.37	9005.64	281.43	
Promedio	249.31	263.74	266.29	267.17	298.13	282.04	318.38	306.34			
Temperaturas de extracción por vapor				210 °C =	4186.06		220 °C =	4819.58			
					261.63			301.22			
Periodos tiempo de extracción por vapor				5.0 min =	4372.90		10.0 min =	4632.74			
					273.31			289.55			

ANEXO 3.9. Determinación de Metanol (ppm) obtenidos en la etapa de la destilación.



Factor A = Tipo sustrato	Factor B = Temperaturas de extracción por vapor								Tipo sustrato	
	210 °C				220 °C				Sumatori a	Promedio
	Factor C = Tiempo de extracción por vapor				Factor C = Tiempo de extracción por vapor					
	5.0 min		10.0 min		5.0 min		10.0 min			
Hojas	27.56	27.57	29.21	34.49	31.34	31.48	36.65	36.20	508.32	31.77
	27.73	27.57	29.24	32.55	31.79	31.49	36.88	36.58		
Tallo	196.09	160.03	227.21	24.01	291.51	296.85	352.64	365.66	3966.16	247.88
	177.65	168.01	233.69	147.32	279.47	311.22	396.72	338.07		
Sumatoria	429.02	383.18	519.36	238.37	634.10	671.04	822.88	776.51	4474.48	139.83
Promedio	107.26	95.80	129.84	59.59	158.53	167.76	205.72	194.13		
Temperaturas de extracción por vapor				210 °C =	1569.94	220 °C =	2904.54			
					98.12		181.53			
				5.0 min =	2117.35	10.0 min =	2357.13			
Periodos tiempo de extracción por vapor					132.33		147.32			

ANEXO 3.10. Presupuesto de investigación

Rubro	Unidad	Cantidad	Costo		Total
			Unitario		S/.
Gastos indirectos					13981.00
Servicios					13615.00
Análisis de Biomasa	Unidad	16	150		2400.00
Análisis de planta	Unidad	16	100		1600.00
Análisis de etanol	Unidad	16	400		6400.00
Elaboración de Fermentadores	Unidad	4	500		2000.00
Impresión de fotos	Unidad	5	35		175.00
Digitación	Unidad	200	1		200.00
Fotocopias	Unidad	400	0.1		40.00
Impresión	Unidad	8	100		800.00
Material de oficina					254.00
Papel dina A 4	Millar	3	16		48.00
USV	Unidad	2	70		140.00
Libreta de campo	Unidad	4	6		24.00
Plumones	Unidad	12	2		24.00
Lapiceros	Unidad	6	2		12.00
Lápices	Unidad	6	1		6.00
Procesamiento					112.00
Molienda	Hora/maq	32	1		32.00
Pretatamiento	Hora/maq	32	1		32.00
Fermentación	Hora/maq	32	0.5		16.00
Destilación	Hora/maq	32	1		32.00
Gastos indirectos					1000.00
Movilidad	unidad	40	20.00		800.00
sacos	unidad	250	0.80		200.00
Sub total					S/. 14,981.00
Imprevistos 10 %					S/. 1,398.10
Total					S/. 16,379.10

Fuente de financiamiento: Investigador.